



UNIVERSIDAD DE CUENCA

VLIR-Network Ecuador

**Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en
Biodescubrimiento**

TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a
la raíz de *Pleurothallis coriacardia* y evaluación de su efecto en el
desarrollo de sus semillas**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de
Magister en Biociencias Aplicadas**

AUTOR: Blga. Gabriela Patricia Maldonado Cedeño C.I. 0104713664

**TUTOR: Blga. Denisse Peña Tapia MsC. (Universidad de Cuenca)
C.I. 0102501889**

COTUTOR: Ing. Juan Manuel Cevallos PhD. (ESPOL) C.I. 1310261340

ASESOR: Andrés Yarzábal PhD. (Universidad de los Andes) C.I. 0151710431

Cuenca, Ecuador
2017



RESUMEN

Las orquídeas son conocidas por establecer una relación simbiótica, hasta ahora bipartita, con hongos formadores de micorrizas. Pese a que la información disponible sobre hongos micorrízicos de orquídeas es abundante, muy poco se conoce sobre la diversidad de microorganismos endófitos que colonizan sus raíces. Menos aún es lo que se sabe sobre las relaciones que se han establecido entre orquídeas de ambientes neotropicales andinos y los microorganismos que habitan en sus raíces. Este trabajo presenta el primer acercamiento al estudio de las comunidades de microorganismos endófitos - cultivables y no cultivables - que colonizan las raíces de *Pleurothallis coriacardia*. Reportamos el aislamiento de hongos endófitos cultivables, relacionados a Psathyrellaceae, clado poco estudiado como micorrízico, con una actividad promotora en el desarrollo post-embrionario de las semillas de *P. coriacardia* hasta un estado de ruptura de testa. La comunidad de microorganismos endófitos caracterizada por métodos moleculares reporta setenta y siete UTO (Unidades Taxonómicas Operacionales) fúngicas, con aislados filogenéticamente cercanos a los órdenes Atractiellales y Sebaciales, mientras que para la comunidad de bacterias endófitas se reporta la presencia de 66 UTO, principalmente cianobacterias. Este análisis molecular confirma postulados de asociación de orquídeas tropicales hacia una amplia gama de taxones reconocidos como micorrízicos y endófitos, abriendo la posibilidad hacia el esclarecimiento de diversidad de roles ecológicos que estos organismos pueden estar cumpliendo en la planta. Este estudio da soporte a postulados relacionados con una especificidad variable entre orquídeas tropicales y sus hospederos fúngicos.

Palabras claves: *Pleurothallis coriacardia* ▪ orquídeas ▪ endófitos ▪ diversidad ▪ desarrollo embrionario ▪ litófito ▪ epífita ▪ secuenciación Illumina



ABSTRACT

The family Orchidaceae is recognized as an important plant-group due to their mutualistic interactions with fungi assembling mycorrhiza interactions. Despite the abundant information about mycorrhizal relationships, the knowledge of diversity patterns of endophytic microorganisms at orchid-roots is poorly understood. Particularly, in the Neotropic, the knowledge on Andean orchids and the diversity of microorganisms that inhabits their roots is very limited. We collected samples of roots in a montane forest in southern Andes of Ecuador and characterize the endophytic communities - cultivable and noncultivable – that colonize *Pleurothallis coriacardia* roots. We report the isolation of cultivable endophytic fungi, related to Psathyrellaceae, a clade poorly studied as mycorrhizal, with a promotor activity in the post-embryonic development of the seeds of *P. coriacardia* to a testa rupture stage. The community of endophytic microorganisms characterized by molecular methods reports seventy-seven OTU (Operational Taxonomic Units) phylogenetically close to the Atractiellales and Sebaciniales orders, while the community of endophytic bacteria reports the presence of sixty-six OTU, mainly cyanobacteria. This molecular analysis confirms postulates of association of tropical orchids to a wide range of taxa recognized as mycorrhizal and endophytes, opening the possibility to clarify the diversity of ecological roles that these organisms may be fulfilling in the plant. Within this context, our results contribute to the knowledge of the high diversity in composition of the entire endophytic community and to the understanding of complex interactions of Andean orchids and their endophytic hosts.

Keywords: *Pleurothallis coriacardia* ▪ Orchidaceae ▪ endophytes ▪ diversity ▪ embryo development ▪ lithophytic ▪ epiphytic ▪ Illumina sequencing



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
AGRADECIMIENTOS	9
DEDICATORIA	10
1. Introducción	11
2. Metodología	13
2.1 Área de colección y especie de estudio	13
2.2 Colección de raíces y semillas	14
2.3 Aislamiento y cultivo de hongos endófitos	15
2.4 Ensayos de desarrollo embrionario de semillas de <i>P. coriocardia</i>	16
2.5 Caracterización de la comunidad de microorganismos endófitos asociados a las raíces de <i>P. coriocardia</i>	17
3. Resultados	18
3.1 Descripción de la especie estudiada	18
3.2 Aislamiento de hongos endófitos cultivables	19
3.3 Ensayo preliminar de promoción del desarrollo embrionario de semillas de <i>P. coriocardia</i>	22
3.4 Ensayo definitivo de promoción de desarrollo embrionario de semillas de <i>P. coriocardia</i>	23
3.5 Caracterización de la comunidad de microorganismos endófitos asociados a raíces de <i>P. coriocardia</i> mediante secuenciación masiva	28
4. Discusión	31
4.1 Hongos endófitos cultivables de <i>P. coriocardia</i>	32
4.2 Promoción del desarrollo embrionario de semillas de <i>P. coriocardia</i>	33
4.3 Comunidad de microorganismos endófitos	35
Referencias	39
Anexos	47



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distintos pasos y condiciones para la amplificación del ADN metagenómica de raíces de <i>P. coriocardia</i>	17
Tabla 2. Descripción de la comunidad de hongos endófitos de <i>P. coriocardia</i>	28
Tabla 3. Resultados de valor de p (0.05) sobre preferencia de micobiontes a sustratos específicos de colonización de <i>P. coriocardia</i> por simulación de MonteCarlo.....	29
Tabla 4. Descripción de la comunidad de bacterias endófitas de <i>P. coriocardia</i>	30
Tabla 5. Resultados de valor de <i>P</i> (0.05) sobre preferencia de bacterias endófitas a sustratos específicos de colonización de <i>P. coriocardia</i> por simulación de MonteCarlo.....	31



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hábitos a) epífitos y b) litófitos de crecimiento de <i>Pleurothallis coriacardia</i>	13
Figura 2. Ubicación del Área de Colección, cuadrantes en color rojo, con ubicación aproximada de transectos establecidos.....	14
Figura 3. a) Raíces de <i>P. coriacardia</i> en sustrato rocoso, la fecha indica la coloración verde-traslúcida de la punta, porción colectada. b) Cápsula madura abierta de <i>P. coriacardia</i>	15
Figura 4. Propágulos asexuales formados desde el peciolo de las hojas, que da lugar a un nuevo espécimen.	18
Figura 5. Plántulas de orquídeas registrados en el Bosque de Mazán (a) sustrato arbóreo Arrayán - <i>Myrcianthes rhopaloides</i> y (b) sustrato rocoso.....	19
Figura 6. Diversos morfotipos similares al género <i>Fusarium</i> (a) Cepa 14M2 de coloración de micelio blanquecino y crecimiento circular (b) Cepa 24M2 crecimiento irregular y de coloración central marrón (c) Cepa 7M5 afín a <i>Fusarium/Gibberella tricinum</i> con una coloración distintiva rosada.....	19
Figura 7. a) Macroscopia y b) microscopia del morfotipo de 6M3 - <i>Ilyonectria</i> , c) morfotipo 10M3 – <i>Bionectria</i>	20
Figura 8. Diversos morfotipos pertenecientes al género <i>Coprinellus</i> (a) Cepa 19M2 (b) Cepa 21M1 (c) Cepa 32M5.	20
Figura 9. Distintos morfotipos presentes en la colección de hongos endófitos de <i>P. coriacardia</i> , a) Morfotipo con características de <i>Umbelopsis</i> 22M, b) Morfotipo de 1M4 <i>Nigrospora</i> ; Morfotipo de 1M2 <i>Psilocybe</i> c) inmadura d) madura; Morfotipo de 12M <i>Epicoccum</i> e) juvenil f) madura.	20
Figura 10. Géneros y abundancia de hongos endófitos aislados a partir de <i>P. coriacardia</i> . ..	21
Figura 11. Diversidad de especies de hongos endófitos calculada por el índice de Shannon por cada sustrato de colección de <i>P. coriacardia</i>	21
Figura 12. Distintos estados de desarrollo observados en el ensayo preliminar, ► Estado 1= Embrión viable,►►Estado 2= hinchamiento del embrión,►►► Estado 3= Ruptura de testa. 22	
Figura 13. Diagrama de cajas del diámetro de las semillas por cada estado de desarrollo evaluado	23
Figura 14. Porcentaje de semillas en distintos estados de desarrollo en presencia de hongos endófitos al cabo de 90 días de observación después de la siembra.	23
Figura 15. Porcentaje de semillas en distintos estados de desarrollo en presencia de hongos endófitos al cabo de 60 días de observación después de la siembra.	24
Figura 16. Diferente comportamiento de cepa 6M3- <i>Ilyonectria</i> frente a las semillas (a) ensayo preliminar (b) ensayo definitivo.....	24



Figura 17. Semillas en distintos estados de desarrollo embrionario en presencia de las cepas a) 22M2.1 <i>Coprinellus</i> b) 20M3 <i>Coprinellus</i> c) 18.1M3 <i>Coprinellus</i> d) 19M1.4.1 <i>Coprinellus</i> , ► Estado 1= Embrión viable, ►► Estado 2= hinchamiento del embrión, ►►► Estado 3= Ruptura de testa.	25
Figura 18. Porcentaje de semillas en distintos estados de desarrollo en presencia de hongos endófitos al cabo de 90 días de observación después de la siembra.	25
Figura 19. a) Control negativo b) Control positivo.	26
Figura 20. Media de las mediciones de diámetro para las semillas de <i>P. coriocardia</i> en presencia de las distintas cepas, barra en color amarillo cepas que mostraron una diferencia significativa entre grupos, barra en verde cepas que promovieron un estado de desarrollo 3= ruptura de testa, barra en azul cepas que registraron estado de desarrollo 2= hinchamiento del embrión, barras en naranja cepas que no tuvieron influencia en el desarrollo de la semillas, barra en gris media de los controles.	27
Figura 21. Comparación entre distintos estados de desarrollo de semillas, con inóculos fúngicos y controles, por influencia de valores de pH probados en el ensayo.	27
Figura 22. Desarrollo de semillas después de 150 días de inoculación con las cepas a) 22M2.1 <i>Coprinellus</i> y b) 19M1.4.1 <i>Coprinellus</i> a manera de rizoides coraloides.	28
Figura 23. Comparación de índices de diversidad beta de las comunidades de hongos analizadas con la prueba posterior de Tukey para a) los distintos su tratos de colección de <i>P. coriocardia</i> y b) comparación entre todos los sustratos arbóreos y rocas	29
Figura 24. Comparación de índices de diversidad beta de las comunidades de bacterias analizadas con la prueba posterior de Tukey para a) los distintos sustratos de colección de <i>P. coriocardia</i> y b) comparación entre todos los sustratos arbóreos y rocas	31



DERECHO DE AUTOR



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Gabriela Patricia Maldonado Cedeño, autor/a del Trabajo de Titulación "Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *Pleurothallis coriocardia* y evaluación de su efecto en el desarrollo de sus semillas", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Biociencias Aplicadas. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor/a

Cuenca, 12 de Junio del 2017

Gabriela Patricia Maldonado Cedeño

C.I: 0104713664



CLAUSULA PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Gabriela Patricia Maldonado Cedeño, autor/a del Trabajo de Titulación "Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *Pleurothallis coriacardia* y evaluación de su efecto en el desarrollo de sus semillas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de Junio del 2017

Gabriela Patricia Maldonado Cedeño

C.I: 0104713664



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo del grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular y Propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, por lo que expreso mis sinceros agradecimientos a Blga. Denisse Peña MsC., Blga. Jazmín Salazar MsC., Ing. Eduardo Chica PhD., Ing. Paulina Villena MsC., Dr. Antonio Vallecillo PhD. y en especial al Dr. Andrés Yarzabal PhD. por sus invaluable aportes.

Agradezco también al Ing. Juan Manuel Cevallos PhD., Ing. Gabriela Maridueña MsC. y a la Blga. Adela Quevedo del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – CIBE, Área de Fitopatología, por toda la ayuda brindada.

A los estudiantes y tesisistas del Laboratorio de Biología Molecular y *Propagación in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por su compañía y las enseñanzas compartidas.

A mis padres Tasho, Pachi y a mis hermanas por su amor, apoyo y sobre todo su paciencia, a mis queridas tías Anita y Alicia sin su apoyo nada de esto fuera posible.

Además, a la Subgerencia de Gestión Ambiental de ETAPA EP, encargada del manejo y conservación del Bosque Protector Mazán gracias por el otorgamiento oportuno de los respectivos salvoconductos para el ingreso al bosque.

Un agradecimiento especial al programa de postgrados de la Red VLIR Ecuador.



DEDICATORIA

A Nina, Tessa y Suca por ser la luz en mi vida.



Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *Pleurothallis coriocardia* y evaluación de su efecto en el desarrollo de sus semillas

Gabriela Maldonado C.

Tutor: Blga. Denisse Peña T. MsC.¹
Co-Tutor: Juan Manuel Cevallos C. PhD.²
Asesor: Luis Andrés Yarzabal PhD.³

1 Laboratorio de Biología Molecular y cultivo in vitro, Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, (Cuenca-Ecuador).

2 Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica de Litoral (ESPOL), (Guayaquil - Ecuador)

3 Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (Mérida-Venezuela)

1. Introducción

Las relaciones simbióticas entre microorganismos y plantas han llamado la atención desde su descripción inicial hace 137 años (De Bary, 1879). Desde entonces, numerosas investigaciones sugieren que la mayor parte, si no todas, de las especies vegetales en ecosistemas naturales establecen relaciones simbióticas con microorganismos endófitos (Sun y Guo 2012). Este diverso grupo de organismos, que incluye hongos y bacterias, son capaces de vivir dentro de los tejidos de su hospedero vegetal sin causarle ningún daño aparente (Bayman y Otero 2006). Las interacciones entre microorganismos endófitos y plantas pueden ir desde mutualismo hasta saprofitismo, relaciones que han condicionado la ecología, sobrevivencia y evolución de la planta hospedera y, por tanto, parecen jugar un rol muy importante en el mantenimiento de la estructura y diversidad de la comunidad y a su vez del ecosistema que habitan (Tao et al 2008).

Pese a ser un grupo antiguo y altamente especializado, la familia Orchidaceae presenta índices elevados de diversificación y especiación en la actualidad, probablemente debido a un ciclo de vida dependiente de la interacción simbiótica con hongos (Waterman y Bidartondo 2008; Otero et al 2002; Zettler et al 2003). De hecho, el desarrollo de orquídeas depende del establecimiento de asociaciones con hongos micorrízicos, quienes actúan, ya sea como proveedores o fuente de nutrientes, comportamiento conocido como *micoheterotrofia* (Yoder J., Zettler y Stewart 2000; Kottke y Suárez 2009; Zettler et al 2003; Kottke et al 2013; Riofrío et al 2013).

En el caso de orquídeas aclorofílicas (no realizan fotosíntesis), los hongos micorrízicos parecen cumplir un rol importante durante toda la vida de la planta, al proporcionar carbono orgánico y otros nutrientes (Zettler et al 1998), por lo que son frecuentes altos niveles de especificidad orquídea-hongo (Cevallos et al 2016). Mientras que para orquídeas epífitas fotosintéticas la especificidad en este tipo de simbiosis parece ser menos específica, existen reportes de patrones comunitarios similares en distintas especies de orquídeas, principalmente asociadas a hongos de las familias Ceratobasidiaceae, Serendipitaceae, Tulasnellaceae y Atractiellomycetes



(Suárez y Kottke 2016). Igualmente existen reportes sobre el efecto promotor de una misma cepa de hongo sobre la germinación de diversas especies de orquídeas (Zettler et al 1999).

Estudios relacionados con la simbiosis entre hongos y orquídeas han dejado de lado el análisis de comunidades bacterianas asociadas a estas plantas, con excepción de reportes puntuales sobre bacterias rizosféricas (Philippot et al 2013); sin embargo, este último grupo de microorganismos podría representar un tercer componente fundamental en estas asociaciones, ya que las bacterias se encuentran estrechamente relacionadas con los hongos micorrízicos y son conocidas como bacterias satélite o ayudantes (Bondante y Andra Anca 2009). Aunque las interacciones interespecies/interfilum, bacterias – hongo – planta todavía no están claras y son difíciles de demostrar, algunos trabajos puntuales mencionan una tendencia a considerar a las micorrizas como asociaciones tripartitas cuya dinámica es crucial, tanto para el funcionamiento de las micorrizas como a nivel superior, en la estructura de ecosistemas complejos (Teixeira da Silva et al 2015).

Al parecer, las presiones ecológicas tendrían un papel fundamental en la especificidad reportada en las relaciones simbióticas establecidas entre orquídeas y microorganismos (Cevallos et al 2006; Majerali y Klironomos 2007; Glynou et al 2015). Además, considerando que las orquídeas epífitas se desarrollan en condiciones adversas, con reducida disponibilidad de agua y de nutrientes orgánicos e inorgánicos, la colonización de sustratos arbóreos o forófitos (especies arbóreas que hospedan a las orquídeas) y -sobre todo- de sustratos en proceso de descomposición presentaría mayores ventajas como fuente de provisión de carbono que sustratos rocosos. De esta forma, especies que presentan hábitos epífitos (crecimiento en especies arbóreas) y litófitos (crecimiento en rocas) podrían estar asociadas a comunidades de microorganismos distintos, en función de la necesidad de recursos (Xing et al 2015; Bayman y Otero, 2006).

El conocimiento de micobiontes (componente fúngico de una simbiosis) específicos de orquídeas tropicales puede ser un factor crítico para la conservación y propagación de ciertas especies, principalmente aquellas con poblaciones pequeñas y patrones de distribución reducida (Suárez y Kottke 2016; Kottke y Suárez 2009). La comprensión de la identidad y la filogenia de los principales grupos de hongos asociados a estas orquídeas, así como el conocimiento de la especificidad y el grado de significancia simbiótica entre estos grupos y sus hospedadores podría ser un factor clave en los esfuerzos de conservación futuros, principalmente en remanentes aislados de bosque altoandino.

En Ecuador son muy pocos los grupos que siguen esta corriente de investigación, a pesar de que la familia Orchidaceae es la más numerosa entre plantas superiores del país (Jørgensen , Ulloa y Maldonado 2006), con 228 géneros y aproximadamente 4032 especies descritas (Riofrío et al 2007). La región Andina, por sus características climáticas y geográficas, alberga el mayor número de especies de orquídeas epífitas endémicas. Muchas de estas especies están amenazadas, aproximadamente el 85% (Valencia 2010; Cribb et al 2003), principalmente debido a actividades antrópicas que causan perturbaciones en su hábitat (Jiménez 2005).

Entre estas especies se incluyen las pertenecientes al género *Pleurothallis*, considerado como el segundo género de orquídeas con mayor número de especies endémicas en Ecuador (Jiménez 2005). De acuerdo con el CITES, las especies de este género presentan estrictas regulaciones en su comercio y se reconoce una dependencia de la venta a la extracción ilegal de especímenes directamente de la naturaleza, con pocos comercios dedicados a su

reproducción. Además, el género *Pleurothallis* se describe como dependiente de la polinización por insectos para lograr un exitoso desarrollo del fruto y alta viabilidad de las semillas, con reportes de depresión endogámica alta en poblaciones naturales (Borba et al 2001) y reproducción sexual muy limitada (CaraDona y Ackerman 2012).

En esta investigación, estudiamos la comunidad de microorganismos endófitos asociados a las raíces de *Pleurothallis coriacardia*, especie nativa de los Andes y frecuente en el Bosque Protector Mazán, que presenta hábitos epífitos (Figura 1a) y litófitos (Figura 1b). Se trata de una especie sobre la cual se dispone de información muy limitada respecto a su ecología, relaciones simbióticas y distribución.



Figura 1. Hábitos a) epífitos y b) litófitos de crecimiento de *Pleurothallis coriacardia*

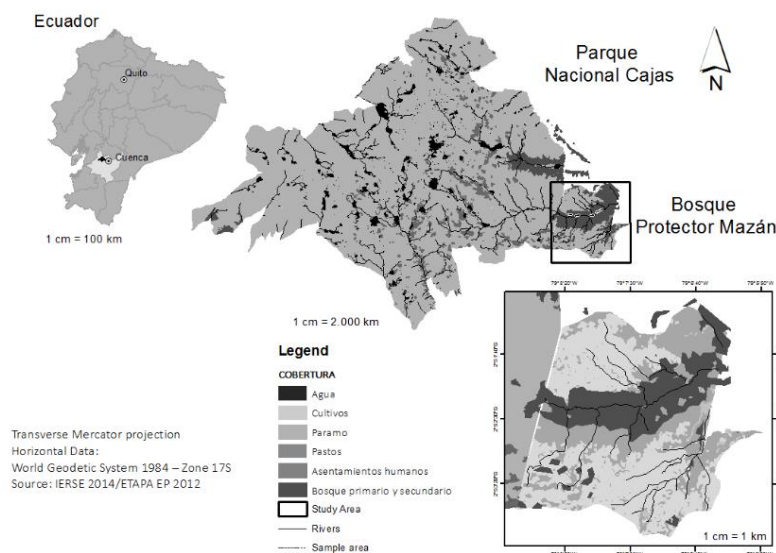
Se aislaron, caracterizaron e identificaron hongos cultivables a partir de segmentos de raíz de plantas adultas de *Pleurothallis coriacardia*, colectadas en distintos sustratos de colonización y se evaluó su efecto en el desarrollo embrionario de semillas de la misma especie. Además, mediante técnicas de secuenciación masiva, se caracterizó la comunidad de microorganismos endófitos (hongos y bacterias), incluyendo especies cultivables y no cultivables, presentes en dichas muestras de raíz.

2. Metodología

2.1 Área de colección y especie de estudio

Las muestras incluidas en el estudio fueron colectadas en el bosque protector de Mazán (Figura 2), ubicado a 10 Km al oeste de la ciudad de Cuenca a 02°50'S y 79°13'O. Este bosque, con muy poca influencia antropogénica, tiene un área total de 2640 ha, ubicadas entre los 2800 y 3200 m.s.n.m. Su precipitación anual varía entre 1000 y 2000 mm y mantiene un rango de temperatura entre 6 y 12°C. El bosque de Mazán es un representante de los bosques siempre verdes montanos altos y su diversidad vegetal incluye alrededor de 300 especies de plantas vasculares, entre las que destacan 40 especies de epífitas (orquídeas y bromelias) (Guzmán y Moreno 2014). Las zonas adyacentes al río Mazán están cubiertas por bosque primario y bosque secundario maduro, con un importante estrato arbóreo representado por especies como

el “Romerillo” (*Prumnopyts montana*), “Sasar” (*Weimannia fagaroides*), “Pururug” (*Hedyosmum luteunyii*), “Tililin” (*Piper andreaum*), “Jigua” (*Ocotea* sp.) entre otros, que permiten mantener una constante humedad y la ausencia de una estación seca marcada, creando unas condiciones muy particulares para el desarrollo de una importante variedad de especies epífitas, entre ellas las orquídeas (Beltrán 2001).



Esta investigación se realizó en el marco de la Autorización de Investigación Científica N° 093-16-IC-FUNGI-DPAA/MA otorgada por la Dirección Provincial del Ambiente de Azuay en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de áreas naturales y Vida Silvestre.

2.2 Colección de raíces y semillas

En las primeras salidas de campo, efectuadas entre los meses de febrero y marzo del año 2016, se colectaron 35 muestras de raíces en total, para el aislamiento de hongos endófitos cultivables. Estas muestras fueron obtenidas a partir de sustratos rocosos y siete especies de árboles. Las muestras consistieron en varios fragmentos de la punta de las raíces de *P. coriacardia* de aproximadamente 3 cm de longitud cada una, pues se ha reportado que esta parte de la raíz presenta mayores índices de colonización de microorganismos endófitos, sobre todo cuando presenta una coloración verdosa a traslúcida (Figura 3a.) (Yokoya et al 2014). Las primeras salidas de campo permitieron identificar los forófitos más frecuentes para la especie, así como la ubicación de los sustratos rocosos más cercanos, para poder así establecer cinco transectos de colección de las raíces de *P. coriacardia*.

Los cinco transectos estuvieron ubicados en la zona de bosque secundario de la reserva, a lo largo del flanco norte del río Mazán y tuvieron una longitud variable en función de la ubicación de los distintos sustratos. En estos transectos se tomaron 20 muestras en total, cinco por cada sustrato seleccionado: Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*), Sasar (*Weinmannia fagaroides*), *Ocotea* sp. y roca. Además, en los transectos se colectaron cápsulas de semillas,

preferiblemente secas, para ser empleadas en las pruebas de germinación y desarrollo de las semillas (Figura 3b).



Figura 3. a) Raíces de *P. coriocardia* en sustrato rocoso, la fecha indica la coloración verde-traslúcida de la punta, porción colectada. b) Cápsula madura abierta de *P. coriocardia*.

Durante las colectas se intentó reducir, en la medida de lo posible, variables ambientales como zonas con alta insolación, que pudieran influenciar en la composición de hongos en las raíces de orquídea.

2.3 Aislamiento y cultivo de hongos endófitos

Las muestras de raíces fueron transportadas en frío hasta el laboratorio. Una vez allí, fueron desinfectadas usando una combinación de los protocolos de Zettler (1997) y Currah (1987): las raíces se sumergieron en una solución compuesta de cloro 2% - alcohol 70% y agua destilada estéril (1:1:1), durante un minuto y posteriormente se lavaron con abundante agua destilada estéril. Las raíces desinfectadas se trituraron con varilla de vidrio, los fragmentos se sembraron en medio FIM (Fungi Isolation Medium) y las placas se incubaron a temperatura ambiente. Las hifas emergentes de la región cortical, aisladas hasta 96 horas luego de la siembra de las raíces en FIM, fueron subcultivadas en medio agar papa dextrosa (PDA). Las cepas de hongos aislados de esta manera se clasificaron por morfotipos - registrándose datos como coloración, forma de crecimiento y textura del micelio y generándose un registro fotográfico- y posteriormente fueron conservadas en medio avena-agar (OMA por sus siglas en inglés) a 4°C.

La extracción de ADN genómico de estas cepas de hongos se realizó utilizando el protocolo de Ceniz (1992). A partir de este ADN se amplificó la región ITS1-5,8S-ITS2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores universales para eucariotas ITS1 e ITS4 (White et al 1990). El perfil térmico empleado fue el siguiente: 94°C por 3 m, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 s, 57.4°C 45 s y 72°C 45 s, con una extensión final de 7 m a 72°C. La amplificación fue verificada en electroforesis en gel de agarosa 1%. Los amplicones fueron enviados para su secuenciación a la empresa MacroGen (Sur Corea).

Para la identificación molecular de las distintas cepas de hongos, se realizaron asignaciones taxonómicas comparando las secuencias nucleotídicas obtenidas con aquellas depositadas en las bases de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y UNITE (Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification) Ver. 7.1, empleando la herramienta de asignación taxonómica BLAST (Altschul et al 1997). Se realizó un análisis de diversidad entre las muestras por cada sustrato de colección de las plantas calculando el índice de Shannon, el cual permite expresar la uniformidad de los valores de



importancia a través de todas las especies de la muestra (Moreno 2001). Para este análisis se utilizó el Software EstimateS y se analizaron las diferencias entre la riqueza y abundancia de estas comunidades con ANOVA ($p = 0.05$) con Software PAST.

2.4 Ensayos de desarrollo embrionario de semillas de *P. coriocardia*

En condiciones de esterilidad se abrieron las cápsulas de semillas y éstas últimas fueron depositadas en frascos estériles que se almacenaron a -20°C (Zettler y McInnis 1993). Previo a la siembra, las semillas fueron desinfectadas usando el método de Zettler et al (2013) que consiste en sumergir y homogenizar las semillas en una mezcla de etanol 85%, cloro 5% y agua estéril (1:1:1) por un minuto, y posteriormente realizar 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril.

Dos mililitros de la suspensión de semillas desinfectadas se esparcieron en las cajas con medio avena agar - OMA, a un pH aproximado de 7, y se inoculó el mismo con un bloque de cada una de las cepas de hongo a evaluar ($0,5\text{ cm}^2$). Para los ensayos preliminares se utilizaron 168 cepas de hongos aislados a partir de las raíces, con dos repeticiones cada uno, además de controles negativos. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante los dos primeros meses de cultivo y luego las condiciones de fotoperiodo fueron de 16 horas luz/8 horas de oscuridad. Se evaluaron las semillas cada 15 días durante 5 meses, registrando el desarrollo de las mismas en relación a la escala modificada de Seaton y Ramsay (2009). En dicha escala, los estados de desarrollo embrionario de las semillas se clasifican como: 0 = semilla no viable o semillas muertas; 1= semilla con embrión viable; 2= hinchamiento del embrión, semillas germinando; 3=ruptura de testa, embrión engrosado; 4= desarrollo de promeristema; 5=desarrollo de primeras hojas verdaderas. Adicionalmente se registraron datos del diámetro de las semillas por caja en cada estado de desarrollo.

Para el ensayo definitivo se siguió el mismo procedimiento ya descrito, pero se evaluó – además- el efecto del pH del medio de cultivo sobre germinación y el desarrollo de las semillas inoculadas. Para ello, se preparó medio avena-agar a tres distintos valores de pH (4,6 - 5,6 - 6,6); cada uno de estos medios se dispensó en cada uno de los tres segmentos de cajas tripetri y cada uno de ellos se inoculó con un bloque de medio de cultivo conteniendo micelio de cada una de las 15 cepas seleccionados a partir de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar. Se realizaron 10 repeticiones por cada cepa de hongo endófito y se incubaron a temperatura ambiente durante 120 días. Se mantuvieron las mismas condiciones de oscuridad los dos primeros meses y 16 horas luz/8 horas de oscuridad para el resto del ensayo. Se utilizaron además controles positivos para la germinación de las semillas (Phytamax, Phytamax + Ácido giberélico pH 5,6) y controles negativos incubando para ello las semillas sin hongos en medio OMA (pH 4,6 - 5,6 - 6,6). Todas las cajas fueron observadas mensualmente, registrándose el porcentaje de semillas por estado de desarrollo y el diámetro de las mismas. Para el análisis de los ensayos de desarrollo, el porcentaje de semillas en cada estado de desarrollo fue calculado por cada tratamiento al dividir el número de semillas en cada estado por el número total de semillas viables en cada muestra. Los resultados obtenidos tanto del número de semillas por estado de desarrollo como del diámetro se analizó con el software XLSTAT (V. 2014.5.03 Addinsoft 2014) utilizado análisis de varianza ANOVA ($P \leq 0,05$) entre factores y sus interacciones. Posteriormente se efectuó un análisis posterior de Tukey ($P \leq 0,05$). Datos de ambos ensayos fueron transformados a una distribución normal al estandarizar las variables usando la variación de la desviación estandar ($n-1$) previo al análisis.



2.5 Caracterización de la comunidad de microorganismos endófitos asociados a las raíces de *P. coriocardia*

Para la extracción ADN metagenómico microbiano (mezcla de todos los genomas de los microorganismos presentes en el tejido radicular) las raíces fueron desinfectadas según el protocolo de Otero et al (2002): el mismo consiste en baños sucesivos de etanol 75% durante 1 minuto, 2,5% de hipoclorito de sodio por 30 segundos, agua estéril 1 minuto, etanol 75% por 1 minuto y un último lavado en agua estéril por 1 minuto. Las raíces fueron cortadas en pequeños pedazos con la ayuda de un bisturí y, para lograr una ruptura de alto rendimiento de las paredes celulares de las raíces, se utilizó el homogenizador TissueLyzer con esferas de zirconio en dos ciclos de 5 minutos; posteriormente se extrajo y purificó el ADN metagenómico utilizando el kit comercial Purelink Genomic DNA kit (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

A partir de este ADN metagenómico se realizó la amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes a las regiones ITS1-5,8S-TS2, 28 S (para hongos) y 16S ADNr (para bacterias), empleando para ello los cebadores ITS1 e ITS4 (White et al 1990), LROR y LR3 (Vilgalys y Hester 1990) y 341F y 806R (Herlemann et al 2011) respectivamente. El proceso de amplificación y de preparación para la secuenciación masiva en la plataforma Illumina MiSeq consistió en tres pasos de amplificación por PCR, modificado a partir de Lundberg et al (2013). Se detallan las condiciones de PCR utilizadas en cada paso en las siguientes tablas:

Tabla 1. Distintos pasos y condiciones para la amplificación del ADN metagenómica de raíces de *P. coriocardia*.

Region:		ITS1-5,8S-TS2 y 28 S		16S	
Paso 1: Enriquecer ADN		Cebadores específicos ITS1 e ITS4/ LROR y LR3		Cebadores específicos 341F y 806R	
Desnaturalización inicial	12 ciclos	95°C	5 m	95°C	5 m
Desnaturalización		95°C	30 s	95°C	30 s
Alineamiento		52°C	2 m	55°C	30 s
Extensión		72°C	2 m	72°C	15 s
Extensión final		72°C	7 m	72°C	7 m
Paso 2: Cebadores de desplazamiento y adaptadores		ITS1 F1-F6/ITS4 F1- F6 LROR F1-F6/LR3 F1- F6		341F F1-F6/ 806R F1-F6	
Desnaturalización inicial:	12 ciclos	95°C	5 m	95°C	5 m
Desnaturalización		95°C	30 s	95°C	30 s
Alineamiento		52°C	2 m	55°C	30 s
Extensión		72°C	2 m	72°C	15 s
Extensión final		72°C	7 m	72°C	7 m
Paso 3: Unión de Barcode		Primer F/Cebador barcode para cada muestra			
Desnaturalización inicial:	12 ciclos	95°C	5 m	95°C	5 m
Desnaturalización		95°C	30 s	95°C	30 s
Alineamiento		52°C	2 m	55°C	30 s
Extensión		72°C	2 m	72°C	15 s
Extensión final		72°C	7 m	72°C	7 m

Con la adición de cada *barcode* específico por cada muestra, independiente del marcador molecular amplificado, se hizo la verificación en gel de agarosa 1,5% y se procedió a la unión de todas las muestras y posterior purificación para ser enviadas para secuenciación con Illumina

MiSeq 2x250 en el Centro de Investigaciones en Cáncer y Genética (ICBR) de la Universidad de Florida (Gainesville, FL). Se utilizó la plataforma Qiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) para el análisis bioinformático de estas secuencias, utilizando las bases de datos: The GreenGenes Consortium, versión Mayo 2103 para la región 16S ADNr, UNITE ver 7.0 para la región ITS1-5,8S-TS2 y Arb-Silva Release 128 para la región 28S ADNr.

Para realizar el análisis de composición de la comunidad microbiana asociada a las raíces de *P. coriocardia* se calcularon los siguientes índices de diversidad beta: Chao-Jaccard, Chao-Sorensen, Morisita-Horn y Bray-Curtisen (Moreno 2001) por cada sustrato de colección empleando el software Estimates. Estos índices fueron comparados con un análisis de varianza (ANOVA $p = 0.005$). Además, para estimar tendencias o patrones de preferencia de las unidades taxonómicas operacionales (UTO) más representativos, se realizó un Test de MonteCarlo (Guzmán y Moreno 2014).

3. Resultados

3.1 Descripción de la especie estudiada

Pleurothallis coriocardia Rchb. f. es una especie de orquídea fotosintética con hábitos de crecimiento tanto epífitos como litófitos y en el Bosque Protector Mazán es abundante, con poblaciones presente en bosque secundario como en primario.

Las características morfológicas de esta especie, registradas en campo, fueron: crecimiento simpodial, con tallos verdes unifoliales cubiertos en la base por brácteas de coloración verde-morada; hojas oblanceoladas y correosas, subpeciolados en la base; raíces velamentosas de coloración verde-translúcida en la punta; inflorescencia apical de hasta 5 flores por tallo, con coloración variable entre marrón-rojiza hasta amarilla, con sépalos laterales fusionados y con bordes claros, por lo general amarillos, pétalos pequeños y alargados, labio y columna amarilla-verdosa, con polinia de coloración amarilla. En campo se observó un frecuente desarrollo de propágulos asexuales (Figura 4) a partir del peciolo, con desarrollo de raíces sin bulbos y nuevos tallos, como una estrategia de propagación y diseminación por clonación de la especie, en condiciones limitantes.

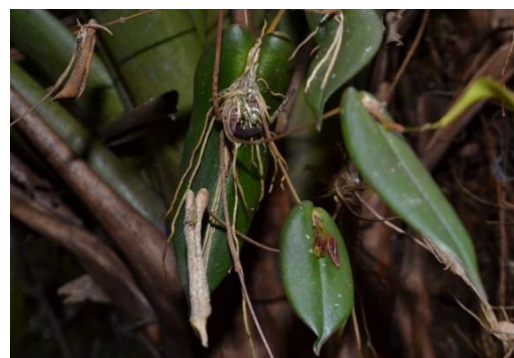


Figura 4. Propágulos asexuales formados desde el peciolo de las hojas, que da lugar a un nuevo espécimen.

Registramos la presencia de la especie en distintos sustratos de colonización, principalmente rocas y en tres forófitos identificados como los más comunes - *Arrayán-Myrcianthes rhopaloides*, *Sarar-Weinmannia fagaroides*, *Ocotea* sp., además en tres forófitos con menos registros *Viburnum triphyllum*, *Prumnopitys montana*, *Polylepis reticulata*, además de ser abundante en sustratos en descomposición que no pudieron ser identificados. A pesar de ser una especie bastante frecuente, *P. coriocardia* formaba parches de vegetación en sitios específicos, en particular, en los sustratos rocosos. Notamos, además, que plantas con propágulos asexuales formados a partir de las hojas eran más frecuentes en el mencionado sustrato. Observamos que el establecimiento de los protocormos era por lo general en

superficies con poco material orgánico y que se encontraba casi desnudo tanto en rocas como en forófitos (Figura 5). Se puede sugerir que, independiente del sustrato (arbóreo o roca), las condiciones de establecimiento, se ven afectadas, lo que puede estar dificultado la germinación de las semillas *in situ*.

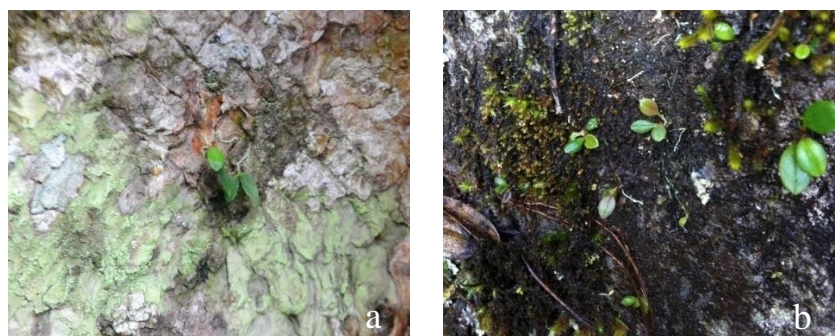


Figura 5. Plántulas de orquídeas registrados en el Bosque de Mazán (a) sustrato arbóreo Arrayán -*Myrcianthes rhopaloides* y (b) sustrato rocoso.

3.2 Aislamiento de hongos endófitos cultivables

En total logramos obtener 177 aislados puros: 22 de ellos provenientes de plantas que colonizan sustratos rocosos, 90 de orquídeas que crecen en los forófitos más representativos - *Weinmannia fagaroides* (15), *Ocotea* sp. (23), *Myrcianthes rhopaloides* (52)- y los 65 aislados restantes procedentes de forófitos menos abundantes ó de sustratos en proceso de descomposición. Los 177 aislados puros fueron agrupados en 122 morfotipos, en base a sus características macroscópicas y microscópicas.

Encontramos gran diversidad de morfotipos en relación a coloración, tipo de crecimiento y estructura de sus hifas. En algunos casos el mismo género presentó varios morfotipos diferentes, como los aislados de *Fusarium* sp. presentados en la Figura 6.

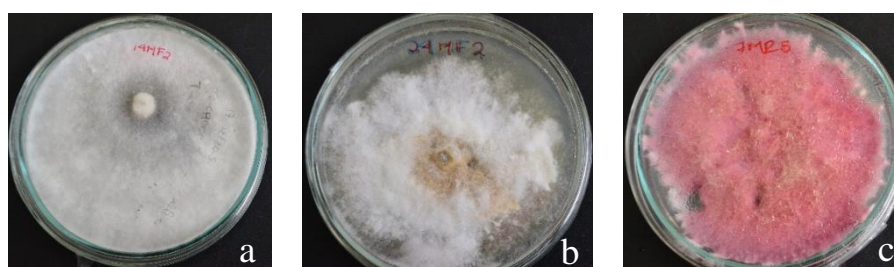


Figura 6. Diversos morfotipos similares s al género *Fusarium* (a) Cepa 14M2 de coloración de micelio blanquecino y crecimiento circular (b) Cepa 24M2 crecimiento irregular y de coloración central marrón (c) Cepa 7M5 afín a *Fusarium/Gibberella tricinum* con una coloración distintiva rosada.

Las cepas similares a la descripción de los géneros *Ilyonectria* (Figura 7a y 7b) y *Bionectria* (Figura 7c), presentaron coloración marrón-anaranjada característica del grupo, con clamidiosporos globosos a subglobosos y formado cadenas, características también reportadas en literatura (Cabral et al 2012).

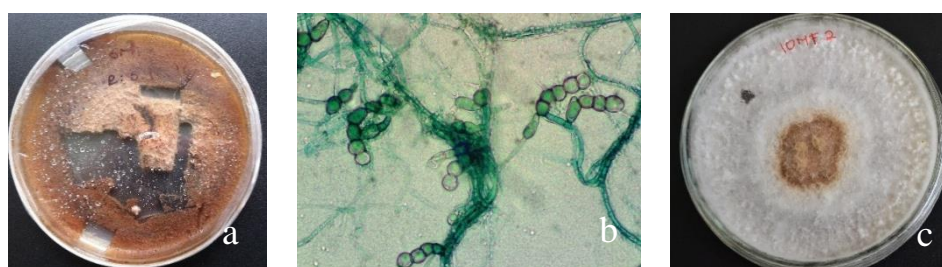


Figura 7. a) Macroscopia y b) microscopia del morfotipo de 6M3 - *Ilyonectria*, c) morfotipo 10M3 – *Bionectria*.

Las cepas de *Coprinellus* sp, mostraron diversidad de morfotipos, con características en general similares a las reportadas para *Rhizoctonia*, es decir, micelio blanco, semi-algodonoso, con bordes definidos y crecimiento circular (Figura 8a). Otras cepas tuvieron una coloración blanca en los bordes y centro amarillo (Figura 8b), que en colonias envejecidas cambió a café-cremoso (Figura 8c), con un crecimiento más rápido que las anteriores y la formación de abundante micelio.



Figura 8. Diversos morfotipos pertenecientes al género *Coprinellus* (a) Cepa 19M2 (b) Cepa 21M1 (c) Cepa 32M5.

Cepas identificadas como *Umbelopsis* sp. (Figura 9a) tuvieron un crecimiento similar a levaduras, con superficie de coloración rosa-anaranjada, con hifas muy delgadas blanquecinas y la formación característica de esporangiosporas. Las colonias de aislados identificados como *Nigrospora* sp. (Figura 9b) presentaron una superficie rugosa, de color gris oscuro en el anverso y negro en el reverso. Mientras que *Psilocybe* (Figura 9c.) tuvo una coloración blanca-cremosa con un crecimiento irregular y lento, observándose una coloración oscuras en colonias envejecidas (Figura 9d). Los aislados identificados como *Epicoccum* sp., presentaron un morfotipo de coloración amarillenta (Figura 9e.), desarrollando una coloración marrón oscura en colonias envejecidas (Figura 9f).

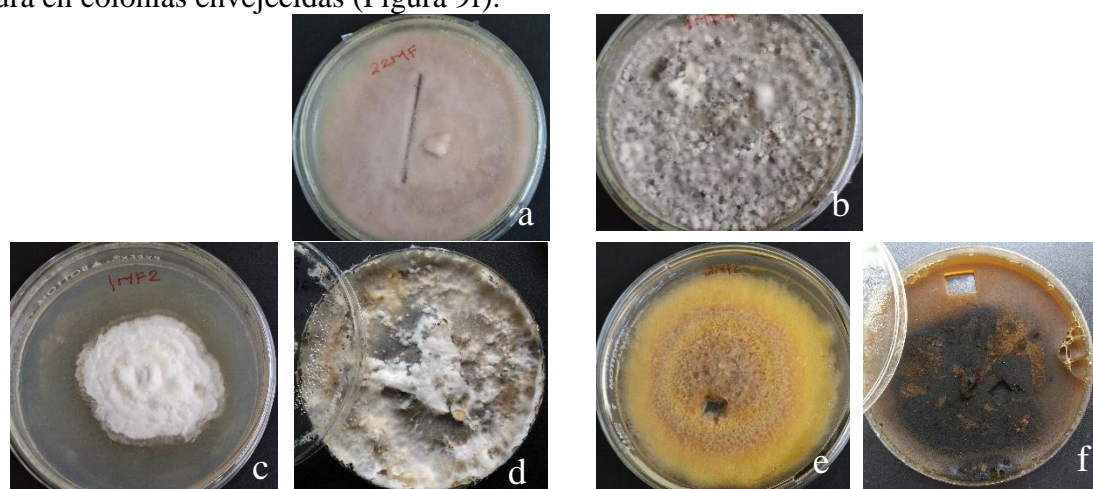


Figura 9. Distintos morfotipos presentes en la colección de hongos endófitos de *P. coriaria*, a) Morfotipo con características de *Umbelopsis* 22M, b) Morfotipo de 1M4 *Nigrospora*; Morfotipo de 1M2 *Psilocybe* c) inmadura d) madura; Morfotipo de 12M *Epicoccum* e) juvenil f) madura.



En base al análisis de las secuencias nucleotídicas de los marcadores moleculares estudiados, los morfotipos diferenciados corresponden a géneros de tres Phyla del reino Fungi: Ascomycota representa un 49% de la colección, Basidiomycota un 24% y Zygomycota un 5%, siendo *Coprinellus* (Familia Psathyrellaceae) el género más registrado con un 15% en toda la colección, seguido por *Fusarium* (Nectriaceae), *Nigrospora* (Trichosphaeriales) ambos con un 7%, y *Trichoderma* (Hypocreaceae) con un 6% (Figura 10.). No fue posible identificar un 22% de la colección de hongos endófitos aislados (Anexo 1. Registro de hongos aislados).

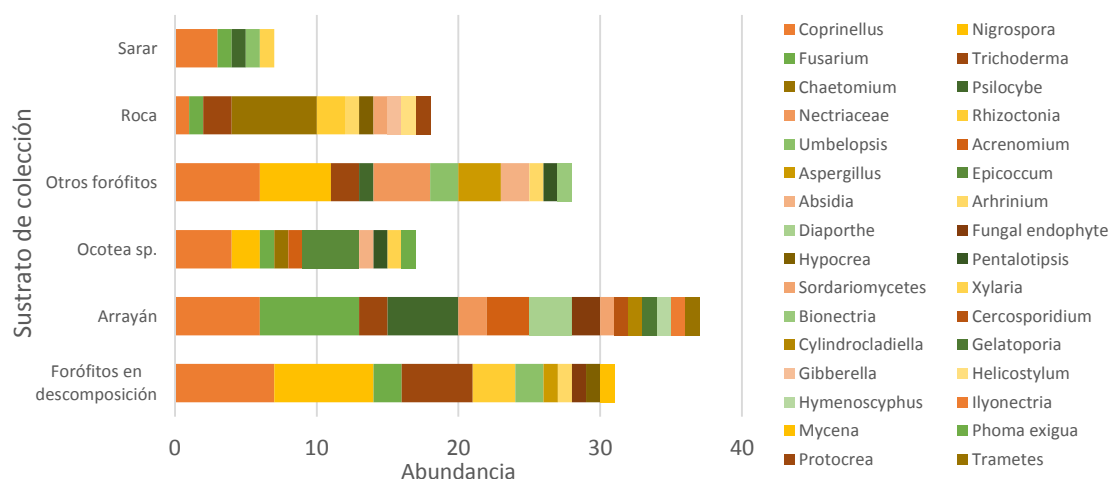


Figura 10. Géneros y abundancia de hongos endófitos aislados a partir de *P. coriocardia*.

Las comunidades analizadas de hongos endófitos cultivables asociados a plantas de *P. coriocardia* que colonizan cada uno de los distintos sustratos estudiados, mostró curvas por diversidad de Shannon ligeramente superiores para Arrayán, seguido por el grupo de forófitos en descomposición, mientras que Sarar fue el sustrato con menor diversidad (Figura 11.). No se encontró una diferencia significativa ($p = 0.08515$) entre la riqueza y abundancia (diversidad) entre sustratos.



Figura 11. Diversidad de especies de hongos endófitos calculada por el índice de Shannon por cada sustrato de colección de *P. coriocardia*.

En cuanto a riqueza, Arrayán presenta el mayor número de géneros exclusivos: *Cylindrocladiella*, *Diaporthe*, *Gelatosporia*, *Hymenoscyphus*, *Cercosporidium*, *Trametes*. En sustratos arbóreos en descomposición, observamos claramente un mayor número de géneros reportados como saprófitos y patógenos, como *Coprinellus*, *Umbelopsis*, *Mycena*, *Arthrrium*, *Hypocrea*, *Ilyonectria*, *Nigrospora* y *Fusarium*. Por otra parte, en los sustratos rocosos identificamos morfotipos estrechamente relacionados con *Fusarium tricinctum* y *Helicostylum*, además de observar una mayor abundancia en individuos del género *Chaetomium*. Finalmente, a partir de plantas que colonizan *Ocotea* sp. aislamos cepas exclusivas y abundantes de *Epicoccum* y *Phoma*.

3.3 Ensayo preliminar de promoción del desarrollo embrionario de semillas de *P. coriocardia*

Observamos un efecto positivo en el desarrollo embrionario de las semillas de *P. coriocardia* aproximadamente a los 30 días de evaluación en 23 de los 168 tratamientos evaluados (medio inoculado con distintas cepas de hongos). Las semillas con el embrión hinchado, correspondiente al estado de desarrollo 2, con las 23 cepas inoculadas, presentaron un progresivo hinchamiento del embrión durante los siguientes meses hasta los 120 días (Figura 12).

Únicamente para las cepas identificadas como 6MF3 - *Ilyonectria*, 18.2M2 – *Nigrospora*. y 12.1M3 - Aff. *Rhizoctonia*, registramos, a los 150 días, un hinchamiento del embrión que dio lugar a ruptura de testa de la semilla, estado de desarrollo 3 (Figura 14). Para el resto de tratamientos se vio un efecto negativo (reducción de tamaño y cambio de coloración) para las semillas en presencia de 96 inóculos fúngicos y para los restantes 46 tratamientos observamos que los embrión permanecían viables pero no presentaron ningún hinchamiento hasta el final del experimento.

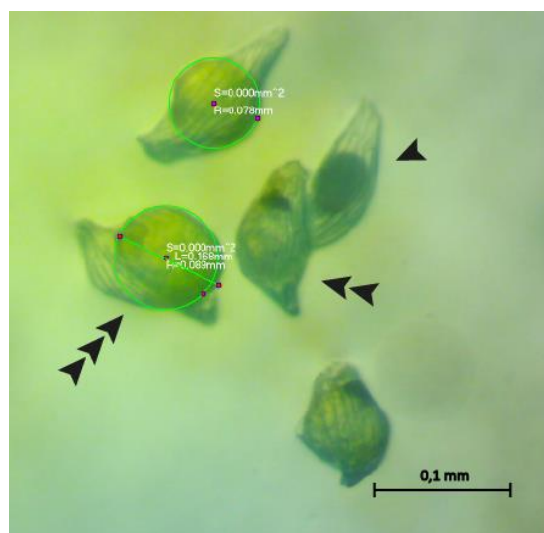


Figura 12. Distintos estados de desarrollo observados en el ensayo preliminar, ➤ Estado 1= Embrión viable, ➤➤ Estado 2= hinchamiento del embrión, ➤➤➤ Estado 3= Ruptura de testa.

La evaluación del diámetro del embrión en los distintos estados de desarrollo y el correspondiente análisis de varianza, permitió discriminar aquellas cepas que no influyeron en el desarrollo embrionario de las que si la hicieron. Encontramos diferencias significativas entre los valores del diámetro del embrión en todos los estados comparados entre sí. Las semillas en

estado 3 (ruptura de testa), mostraron tamaños significativamente superiores al control ($p = < 0,0001$), como se muestra en la Figura 13.

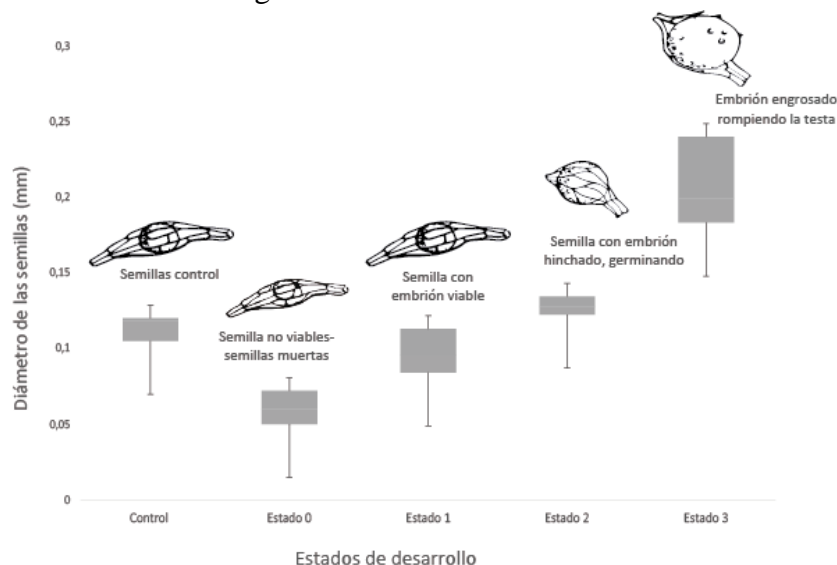


Figura 13. Diagrama de cajas del diámetro de las semillas por cada estado de desarrollo evaluado

En base a los resultados obtenidos en el ensayo preliminar seleccionamos 15 cepas para el ensayo definitivo, considerando aquellas que promovieron el desarrollo embrionario hasta los estados 2 (embrión hinchado) y 3 (ruptura de testa), descartando ocho cepas que no permitieron tener resultados consistentes.

3.4 Ensayo definitivo de promoción de desarrollo embrionario de semillas de *P. coriocardia*

Similar al ensayo preliminar, a los 30 días de evaluación se observó un efecto estimulante de 12 de las 15 cepas sobre el desarrollo del embrión (Figura 14).

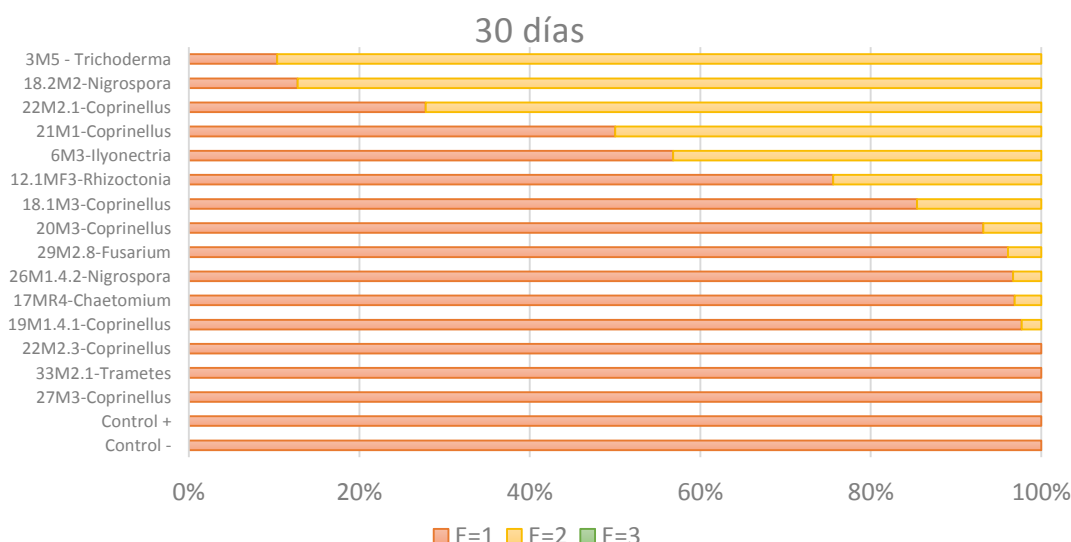


Figura 14. Porcentaje de semillas en distintos estados de desarrollo en presencia de hongos endófitos al cabo de 90 días de observación después de la siembra.

A los 60 días, el porcentaje de semillas en estado 2 y 3 fue superior al 50% en las semillas inoculadas con las cepas 3M5-*Trichoderma*, 6M3-*Ilyonectria*, 18.2M2-*Nigrospora*, 21M1-*Coprinellus*, 22M2.1-*Coprinellus* (Figura 15.), al igual que para 19M1.4.1 y 22M2.1 ambos *Coprinellus* aunque en menores porcentajes. En todos los casos se observó una dispersión del micelio por toda la superficie del medio de cultivo y con un crecimiento más abundante, con el recubrimiento incluso de las semillas.

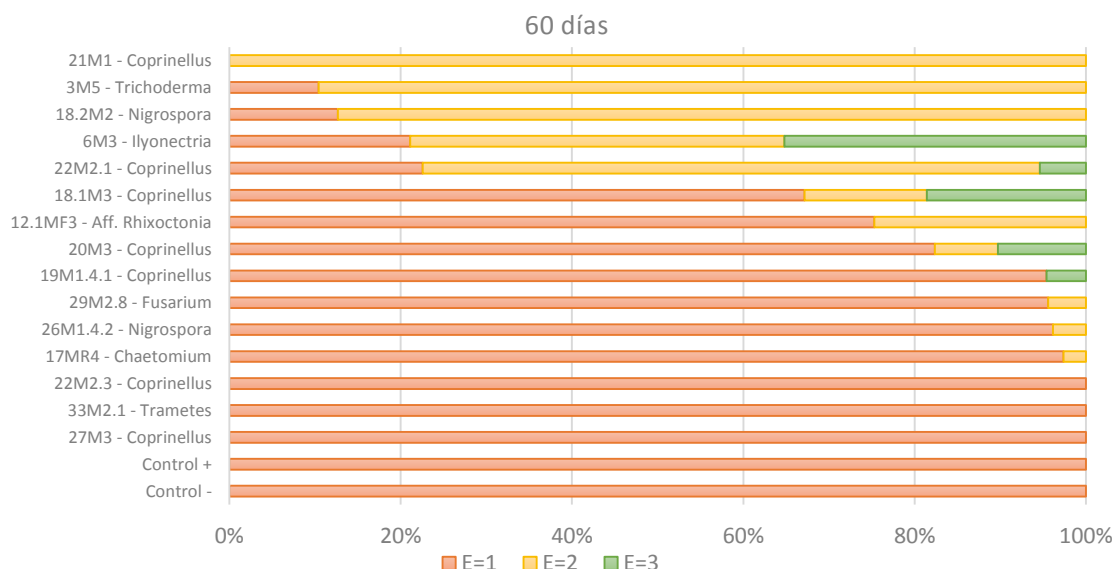


Figura 15. Porcentaje de semillas en distintos estados de desarrollo en presencia de hongos endófitos al cabo de 60 días de observación después de la siembra.

El comportamiento de la cepa 6M3-*Ilyonectria* entre ensayos fue distinto y dependiente del pH del medio. En el ensayo preliminar (pH \approx 7), no se observó un crecimiento de las hifas hacia las semillas (Figura 16a) por lo que se podría pensar en otros factores afectando el intercambio de nutrientes entre hongo – semilla. En observaciones realizadas hasta el décimo mes desde la siembra las semillas de este ensayo, pudimos observar que estas se mantenían viables y en desarrollo. En el ensayo definitivo, la variación de pH del medio promovió un crecimiento significativo de la cepa 6M3-*Ilyonectria*. Además de cubrir la caja Petri, sus hifas cubrieron a cada semilla (Figura 16b). El crecimiento de las semillas inoculadas con esta cepa fue evidente, no podemos afirmar un desarrollo de la semilla con ruptura de testa, aunque se logra ver la formación de otras estructuras junto al embrión, comportamiento registrado a los 90 días de evaluación (Figura 16c.).



Figura 16. Diferente comportamiento de cepa 6M3-*Ilyonectria* frente a las semillas (a) ensayo preliminar (b) ensayo definitivo.

A los 90 días de observación, para las semillas inoculadas con las cepas 22M2.1, (Figura 17a), 20MF3 (Figura 17b), 18.1M3 (Figura 17c), afines a *Coprinellus*, fue posible ver ruptura de testa en 15% o menos del total de semillas evaluadas. En el caso de las cepas 19M1.4.1-*Coprinellus* (Figura 17d) y 29M2.8-*Fusarium* se observó ruptura de testa en muy pocas semillas (Figura 18.). Al cabo de 120 días, no observamos cambios significativos ($p = 0,1312$) en ninguno de los tratamientos.

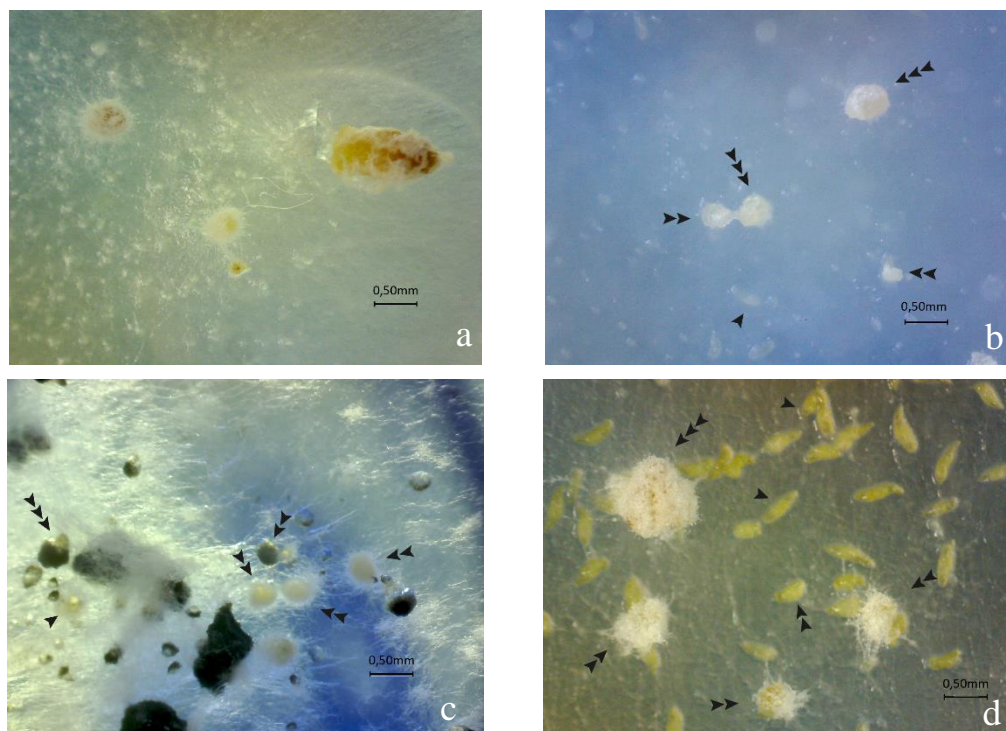


Figura 17. Semillas en distintos estados de desarrollo embrionario en presencia de las cepas a) 22M2.1 *Coprinellus* b) 20M3 *Coprinellus* c) 18.1M3 *Coprinellus* d) 19M1.4.1 *Coprinellus*, ➤ Estado 1= Embrión viable, ➤➤ Estado 2= hinchamiento del embrión, ➤➤➤ Estado 3= Ruptura de testa.

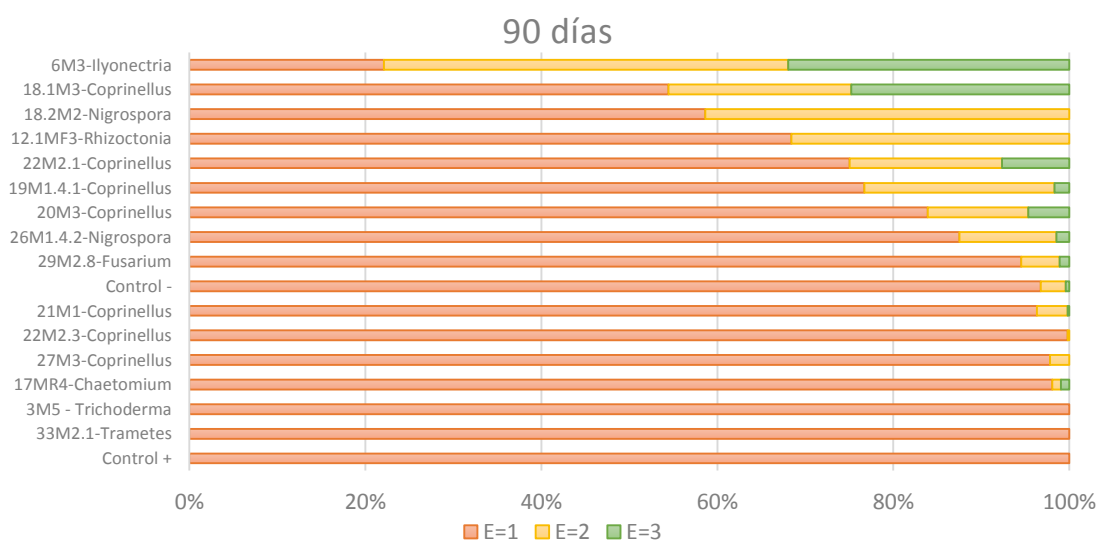


Figura 18. Porcentaje de semillas en distintos estados de desarrollo en presencia de hongos endófitos al cabo de 90 días de observación después de la siembra.

En el caso de los controles negativos (Figura 19a), se pudo observar a los 60 días de evaluación un hinchamiento del embrión en el 84% de las semillas evaluadas, pero no existió mayor desarrollo a partir de ese punto. Al contrario, a los 120 días se observó un menor porcentaje de semillas en este estado de desarrollo (45%). Para los controles positivos (Figura 19b) a los 90 días de evaluación 59 % de las semillas evaluadas llegaron a un estado de desarrollo 1 = embrión viable, pero no existió mayor crecimiento a partir de ese punto. Estas diferencias observadas entre estadíos de desarrollo fueron verificadas en torno al tamaño del embrión de igual manera, aunque no se encontraron diferencias significativas entre controles. Por cada repetición la fuente de semilla fue proveniente de la misma cápsula, por lo que se considera que no existe un sesgo por el origen de la semilla.

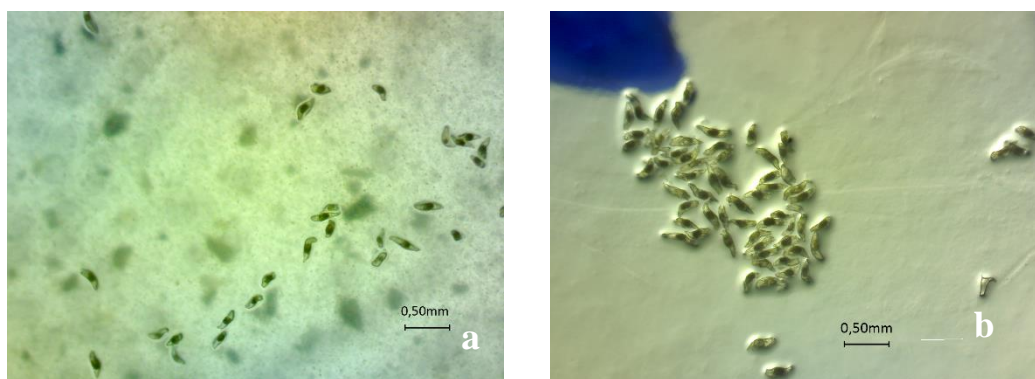


Figura 19. a) Control negativo b) Control positivo.

El análisis de varianza, con los resultados obtenidos a los 120 días de evaluación, entre los diferentes estados de desarrollo embrionario de las semillas mostró una diferencia significativa para 6M3-*Ilyonectria* todas las cepas evaluadas ($p < 0,0001$) y con los respectivos controles positivo ($p < 0,0001$) y negativo ($p < 0,0001$) (Figura 20.).

El análisis de varianza para el diámetro de las semillas permitió determinar una diferencia significativa para los tratamientos 6MF3-*Ilyonectria* ($p < 0,0001$), 22MF2.1-*Coprinellus* ($p < 0,0001$) 19M1.4.1 – *Coprinellus* (0.0151) y 20M3-*Coprinellus* ($p = 0,0072$) (Figura 23.). Los análisis de Tukey posteriores, al confrontar cada cepa evaluada con los controles, permitieron evidenciar diferencias significativas con la excepción de 19M1.4.1-*Coprinellus* y 20M3-*Coprinellus* con el Control negativo (19M1.4.1 $p = 0,5473$; 20M3 $p = 0,3532$) y positivo (19M1.4.1 $p = 0,2618$; 20M3 $p = 0,0913$).

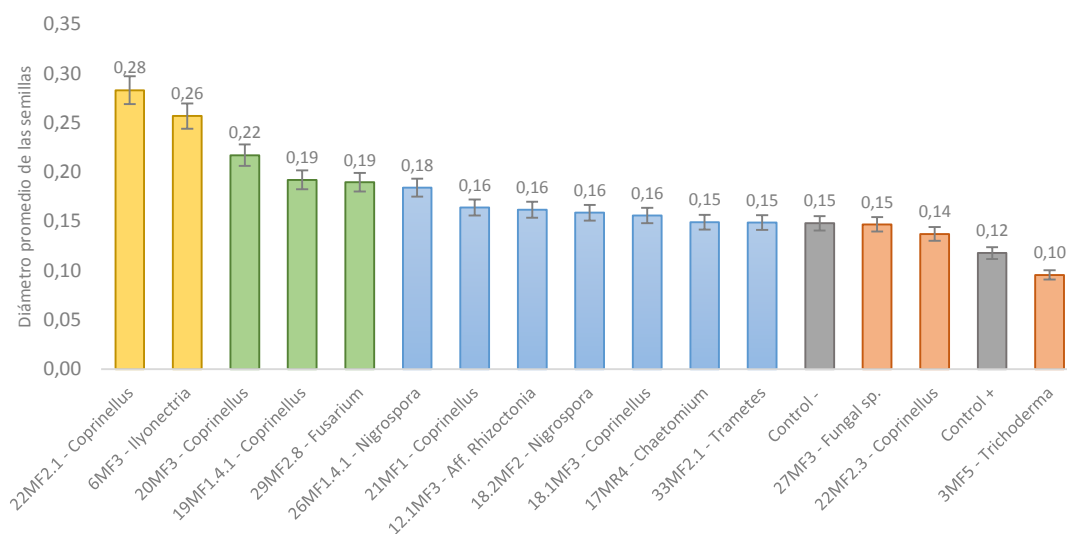


Figura 20. Media de las mediciones de diámetro para las semillas de *P. coriocardia* en presencia de las distintas cepas, barra en color amarillo cepas que mostraron una diferencia significativa entre grupos, barra en verde cepas que promovieron un estado de desarrollo 3= ruptura de testa, barra en azul cepas que registraron estado de desarrollo 2= hinchamiento del embrión, barras en naranja cepas que no tuvieron influencia en el desarrollo de las semillas, barra en gris media de los controles.

Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo definitivo con el ensayo preliminar, comprobamos que la acidificación del medio de cultivo promovió un mayor desarrollo de los hongos, el micelio cubrió por completo la caja y además envolvió a las semillas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estados de desarrollo ($p = 0,4949$) ni diámetro de las semillas ($p = 0,9881$) al comparar el desarrollo de las mismas en presencia de las distintas cepas en los distintos medios con valores de pH (Figura 21).

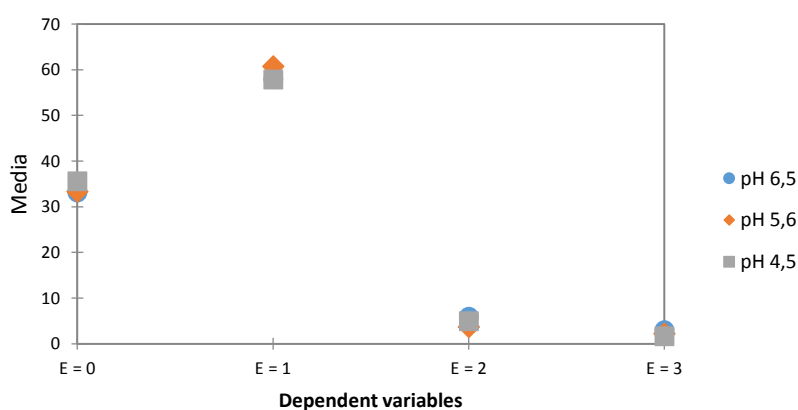


Figura 21. Comparación entre distintos estados de desarrollo de semillas, con inóculos fúngicos y controles, por influencia de valores de pH probados en el ensayo.

En observaciones posteriores realizadas a los 150 días de la siembra, después de culminada la fase experimental, se registraron estructuras de mayor tamaño en las semillas en estado 3, para las cajas inoculadas con las cepas 22M2.1, 20MF3, 18.1M3, 19M1.4.1 – *Coprinellus* y

29M2.8- *Fusarium*, (Figura 22.). Estas estructuras fueron semejantes a cúmulos de tejido vegetal, con coloración oscura (café) y base todavía verde, con desarrollo vertical.

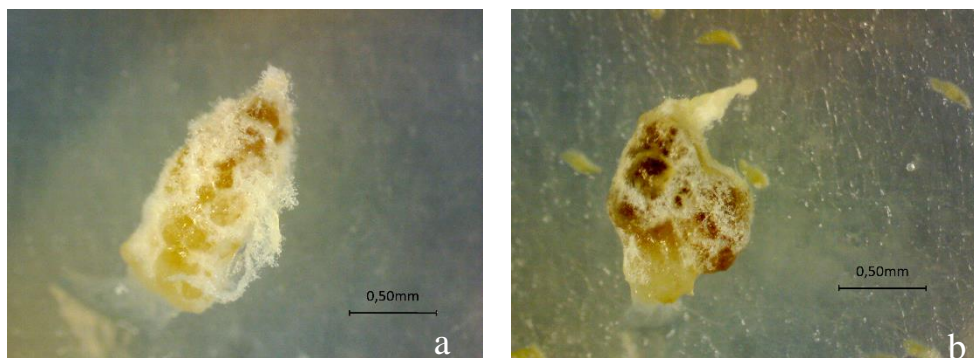


Figura 22. Desarrollo de semillas después de 150 días de inoculación con las cepas a) 22M2.1 *Coprinellus* y b) 19M1.4.1 *Coprinellus* a manera de rizoides coraloides.

3.5 Caracterización de la comunidad de microorganismos endófitos asociados a raíces de *P. coriocardia* mediante secuenciación masiva

Comunidad de hongos endófitos

A partir de las 20 muestras colectadas se obtuvieron un total de 223748 secuencias, siendo posible agruparlas en cuatro Phyla de hongos -Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota- y un grupo de hongos no identificados a este nivel. Las Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs) fueron asignadas principalmente a nivel de familia con un total de 77, siendo Dothideomycetes, Sordariomycetes y Agaricomycetes las que presentaron un mayor número de UTOs (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de la comunidad de hongos endófitos de *P. coriocardia*

Phyla	Clase	# UTO	A.T total	Abundancia relativa	Ocotea		Sara		Arrayán		Roca	
					Abundancia	A. relativa	Abundancia	A. relativa	Abundancia	A. relativa	Abundancia	A. relativa
Ascomycota	Ascomycota	1	13170	0,0589	1563	0,0246	219	0,0024	7378	0,5106	4010	0,0726
Ascomycota	Dothideomycetes	11	1645	0,0074	29	0,0005	97	0,0011	408	0,0282	1111	0,0201
Ascomycota	Eurotiomycetes	3	202	0,0009	25	0,0004	84	0,0009	49	0,0034	44	0,0008
Ascomycota	Lecanoromycetes	1	6	0,0000	0	0,0000	6	0,0001	0	0,0000	0	0,0000
Ascomycota	Leotiomycetes	4	1010	0,0045	529	0,0083	218	0,0024	103	0,0071	160	0,0029
Ascomycota	Orbiliomycetes	1	2	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0001	0	0,0000
Ascomycota	Pezizomycetes	2	5	0,0000	2	0,0000	1	0,0000	2	0,0001	0	0,0000
Ascomycota	Saccharomycetes	4	429	0,0019	114	0,0018	82	0,0009	90	0,0062	143	0,0026
Ascomycota	Sordariomycetes	20	16050	0,0717	13505	0,2130	479	0,0053	337	0,0233	1729	0,0313
Basidiomycota	Agaricomycetes	18	68111	0,3044	2603	0,0410	45423	0,5010	2263	0,1566	17822	0,3228
Basidiomycota	Atractiellomycetes	1	113486	0,5072	44416	0,7004	40322	0,4447	996	0,0689	27752	0,5026
Basidiomycota	Basidiomycota	1	81	0,0004	2	0,0000	30	0,0003	0	0,0000	49	0,0009
Basidiomycota	Microbotryomycetes	1	16	0,0001	1	0,0000	8	0,0001	7	0,0005	0	0,0000
Basidiomycota	Pucciniomycetes	1	8	0,0000	8	0,0001	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000
Basidiomycota	Tremellomycetes	5	51	0,0002	4	0,0001	15	0,0002	5	0,0003	27	0,0005
Chytridiomycota	Chytridiomycota	1	3	0,0000	0	0,0000	1	0,0000	0	0,0000	2	0,0000
No identificado	unidentified	1	9459	0,0423	612	0,0097	3681	0,0406	2804	0,1940	2362	0,0428
Zygomycota	Incertae sedis	1	14	0,0001	1	0,0000	2	0,0000	7	0,0005	4	0,0001



La identificación a nivel de género permitió definir al orden Atractiellales como el grupo más abundante (50%), seguido por Sebacinales (15%), Sebacina (11%), Monographella (6%), Cantharellales (4%) y el resto tuvo una abundancia menor al 1% en toda la comunidad. Atractiellales fue el orden más abundante para las orquídeas presentes en todos los sustratos, aunque fue más frecuente en individuos colectados en los forófitos Sarar y Arrayán; este orden estuvo seguido por los órdenes Sebacinales y Cantharellales. El orden Monographella, ausente en orquídeas que crecen en Sarar, se presenta para Arrayán como muy abundante. Un Ascomycota no identificado fue el taxón más frecuente en plantas asociadas a *Ocotea* y Roca (Anexo 2 A2.1).

Las comunidades de hongos presentes en orquídeas colectadas en distintos sustratos no mostraron diferencias significativas en cuanto a composición (riqueza y abundancia) ($p = 0,5535$), y aunque los índices de diversidad beta analizados mostraron variabilidad entre los sustratos, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, como tampoco analizando todos los forófitos vs rocas ($p = 0.7696$) (Figura 23).

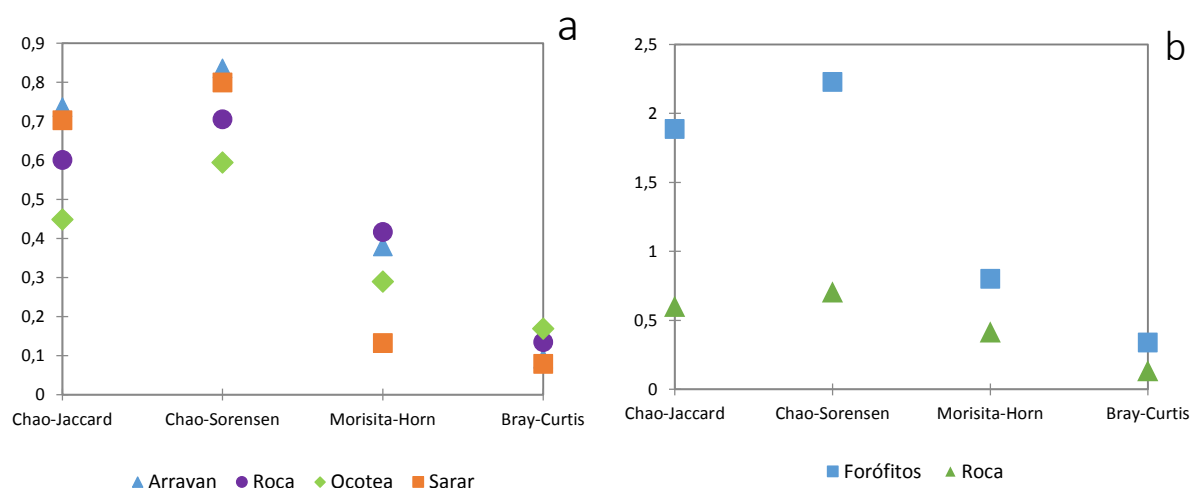


Figura 23. Comparación de índices de diversidad beta de las comunidades de hongos analizadas con la prueba posterior de Tukey para a) los distintos su tratos de colección de *P. coriacardia* y b) comparación entre todos los sustratos arbóreos y rocas

El test de MonteCarlo corroboró esta observación: no se encontró una diferencia significativa para los UTOs identificados por sustrato de colección, ni entre ellos, con valores de p superiores al 0,05 (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de valor de p (0.05) sobre preferencia de micobiontes a sustratos específicos de colonización de *P. coriacardia* por simulación de MonteCarlo.

Variables	Arrayan	Forófitos	Ocotea	Roca	Sarar
Arrayan	0	0,5617	0,6907	0,3159	0,2197
Forófitos	0,5617	0	0,9381	0,5153	0,9856
Ocotea	0,6907	0,9381	0	0,4183	0,4701
Roca	0,3159	0,5153	0,4183	0	0,7869
Sarar	0,2197	0,9856	0,4701	0,7869	0

Comunidad de bacterias endófitas



La comunidad de bacterias presentes en orquídeas colectadas en distintos sustratos, estuvo representada por 227755 secuencias, distribuidas en ocho Phyla: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Cianobacterias y Proteobacteria, siendo estas dos últimas las más abundantes. Alphaproteobacteria, Actinobacteria y Gammaproteobacteria fueron las Clases con mayor número de UTOs asignados, de un total de 66 (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción de la comunidad de bacterias endófitas de *P. coriocardia*

Phyla	Clase	# UTO	Abundancia	A. Relativa	Ocotea		Sasar		Arrayán		Roca	
					Abundancia	A. relativa	Abundancia	A. relativa	Abundancia	A. relativa	Abundancia	A. relativa
Actinobacteria	Acidimicrobiia	2	10	4,4E-05	0	0,0E+00	8	1,5E-04	2	6,1E-05	0	0,0E+00
Acidobacteria	Acidobacteriia	2	23	1,0E-04	5	9,0E-05	15	2,7E-04	2	6,1E-05	1	1,2E-05
Actinobacteria	Actinobacteria	10	824	3,6E-03	4	7,2E-05	173	3,2E-03	644	2,0E-02	3	3,6E-05
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	17	38117	1,7E-01	8980	1,6E-01	7958	1,5E-01	8026	2,4E-01	13153	1,6E-01
Firmicutes	Bacilli	5	67	2,9E-04	5	9,0E-05	13	2,4E-04	29	8,8E-04	20	2,4E-04
Proteobacteria	Betaproteobacteria	6	513	2,3E-03	8	1,4E-04	67	1,2E-03	353	1,1E-02	85	1,0E-03
Acidobacteria	Chloracidobacteria	1	4	1,8E-05	0	0,0E+00	0	0,0E+00	4	1,2E-04	0	0,0E+00
Cyanobacteria	Cyanobacteria	2	184447	8,1E-01	46685	8,4E-01	46164	8,4E-01	20681	6,3E-01	70917	8,4E-01
Bacteroidetes	Cytophagia	1	8	3,5E-05	0	0,0E+00	6	1,1E-04	1	3,0E-05	1	1,2E-05
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	1	13	5,7E-05	0	0,0E+00	0	0,0E+00	13	4,0E-04	0	0,0E+00
Bacteroidetes	Flavobacteriia	2	20	8,8E-05	5	9,0E-05	1	1,8E-05	4	1,2E-04	10	1,2E-04
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	7	3047	1,3E-02	77	1,4E-03	340	6,2E-03	2488	7,6E-02	142	1,7E-03
No definido	No definido	2	5	2,2E-05	0	0,0E+00	0	0,0E+00	5	1,5E-04	0	0,0E+00
Verrucomicrobia	Pedospaerae	1	3	1,3E-05	0	0,0E+00	1	1,8E-05	2	6,1E-05	0	0,0E+00
Planctomycetes	Planctomycetia	4	621	2,7E-03	1	1,8E-05	27	4,9E-04	590	1,8E-02	3	3,6E-05
Bacteroidetes	Saprospirae	1	10	4,4E-05	0	0,0E+00	6	1,1E-04	4	1,2E-04	0	0,0E+00
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	1	6	2,6E-05	0	0,0E+00	1	1,8E-05	5	1,5E-04	0	0,0E+00
Actinobacteria	Thermoleophilia	1	17	7,5E-05	2	3,6E-05	1	1,8E-05	14	4,3E-04	0	0,0E+00

Se identificaron un 81% de secuencias como pertenecientes a la división Streptophyta (Phyla Cianobacterias), seguida por los géneros *Nelumbo*, *Spidolera*, *Rickettsiales* y *Pseudomonas*, con abundancia menor al 10%. Todos estos géneros se identificaron en plantas colectadas en todos los sustratos. En general, se observa una cierta similitud en la comunidad de bacterias que colonizan *P. coriocardia* asociadas a los distintos sustratos analizados (Anexo 2 A2.2).

De hecho, no se encontraron diferencias en relación a composición (riqueza y abundancia) ($p = 0,9976$) de las comunidades por si solas. Sin embargo, al comparar los distintos índices de diversidad beta, por cada sustrato y entre sustratos, se encontró una diferencia significativa para el forófito Sasar con los otros tres sustratos ($p = < 0,0001$) para todos los casos. En su composición, las comunidades asociadas a este forófito presentan una correlación negativa con todos los índices analizados. Al comparar todos los forófitos frente al sustrato roca, se encontró también una diferencia significativa en los índices de diversidad beta ($p = < 0,0001$) (Figura 24.).

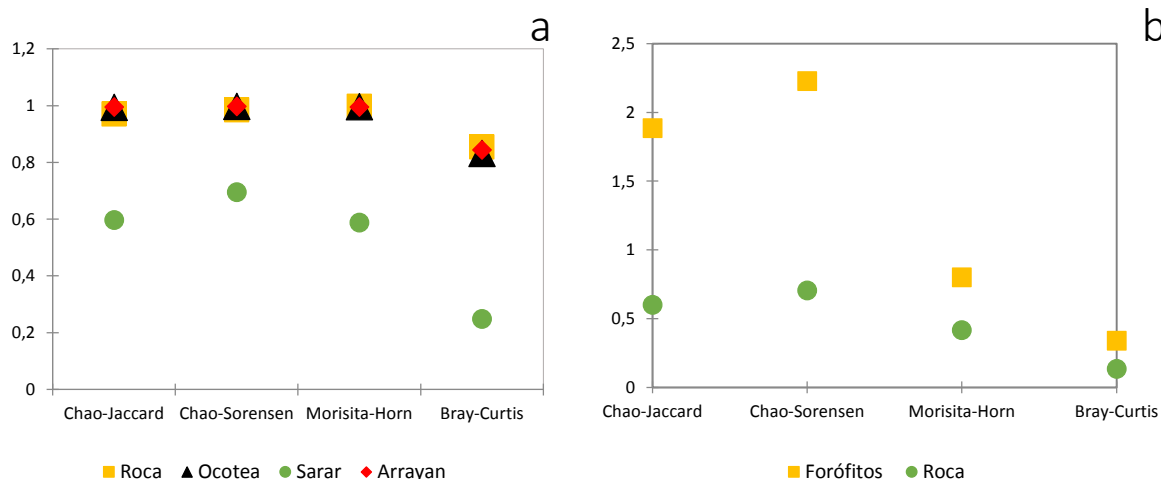


Figura 24. Comparación de índices de diversidad beta de las comunidades de bacterias analizadas con la prueba posterior de Tukey para a) los distintos sustratos de colección de *P. coriacardia* y b) comparación entre todos los sustratos arbóreos y rocas

Al simular el comportamiento de la comunidad por sustratos mediante el test de MonteCarlo y analizando únicamente grupos de bacterias representativos, observamos una diferencia significativa para Roca vs Arrayán (Tabla 5). De hecho, este forófito muestra el mayor número de géneros bacterianos únicos, por lo tanto se muestra como más diverso en contraste con el sustrato roca. En la composición reportada en la Tabla 4 se observa claramente un mayor porcentaje de Cianobacterias y Alfaproteobacterias para las plantas que crecen sobre el sustrato Roca en comparación a los demás sustratos y Arrayán con menor porcentaje.

Tabla 5. Resultados de valor de *p* (0.05) sobre preferencia de bacterias endófitas a sustratos específicos de colonización de *P. coriacardia* por simulación de MonteCarlo.

Variables	Arrayan	Ocotea	Roca	Sarar
Arrayan	0	0,8116	0,0291	0,4217
Ocotea	0,8116	0	0,6960	0,5866
Roca	0,0291	0,6960	0	0,4703
Sarar	0,4217	0,5866	0,4703	0

4. Discusión

Las orquídeas son conocidas por establecer una relación simbiótica, hasta ahora bipartita, con hongos formadores de micorrizas. Este trabajo representa el primer acercamiento al estudio de las comunidades de microorganismos endófitos que colonizan las raíces de *Pleurothallis coriacardia*, confirmando una gran diversidad para especies epífitas/litófitas en los trópicos. Reportamos el aislamiento de hongos endófitos cultivables, relacionados a Psathyrellaceae, clado poco estudiado como micorrízico, con una actividad promotora evidente en el desarrollo embrionario de las semillas de *P. coriacardia* hasta un estado de ruptura de testa. La diversa comunidad de hongos reportada confirma además postulados de asociación de orquídeas epífitas tropicales hacia una amplia gama de taxones reconocidos como hongos micorrízicos y endófitos (Jacquemyn et al 2010; Otero et al 2007; Gowland et al 2011; Phillips et al 2011).



Además abre la posibilidad hacia el esclarecimiento de diversidad de roles ecológicos que pueden estar cumpliendo estos organismos en la planta.

4.1 Hongos endófitos cultivables de *P. coriocardia*

Todos los aislados cultivables evaluados en el presente estudio pertenecen a géneros reportados como hongos endófitos de plantas (Bayman y Otero 2006; Teixeira da Silva et al 2015; Rungjindamai et al 2008, Hynson et al 2013; Jin et al 2013; Glynou et al 2015; Manici et al 2013; Ma et al 2015; Keim et al 2014; Evans et al 2003; Stone et al 2004; Jankowiak et al 2016; Gamboa-Gaitán 2006; Argüelles-Moyao et al 2016). Sin embargo, en muchos casos no se ha profundizado la naturaleza de sus relaciones ecológicas.

Se reporta dentro de los hongos endófitos registrados variedad de géneros con una dualidad en su relación con su hospedero, con rangos ecológicos descritos desde endófitos no destructivos a patógenos muy agresivos (Stone et al 2011). Tal es el caso de *Ilyonectria*, causante de la enfermedad de pie negro en especies forestales y viñas (Cabral et al 2011; Jankowiak et al 2016). Este género y teleomorfos similares, han sido descritos en estudios de comunidades rizosféricas de plantas como *Pyrola* sp., *Populus* sp., *Enkianthus* sp., y como endófito de *Alnus* sp., *Abies religiosa*, *Orthilia secunda* entre otras (Unterseher et al 2013; Obase y Marsuda 2014; Keim et al 2014; Geml et al 2014; Argüelles-Moyao et al 2016; Hynson et al 2013), sin embargo, no se ha profundizado en el conocimiento de roles que estos organismos pueden estar cumpliendo en estas especies vegetales Bonito et al (2014), sin embargo, reporta que existen indicios de efectos positivos de algunas cepas del género *Ilyonectria* en relación con la promoción de la germinación de especies vegetales leñosas, y los resultados presentados en esta investigación, en relación al aislamiento de *Ilyonectria* spp. de raíces de *P. coriocardia* estarían en la misma línea que esta propuesta.

Las cepas pertenecientes al género *Fusarium*, asociado frecuentemente a enfermedades de las raíces de ciertas plantas, han sido reportadas como endófitos de las orquídeas *Eulophia alta* y *Pecteilis susannae*. Estas cepas mostraron un efecto positivo en la germinación simbiótica de estas especies y se confirmó la formación de ectomicorizas en especímenes adultos (Johnson et al 2007; Ovando et al 2005; Kristiansen et al 2004). En esta investigación, cepas identificadas como *Fusarium* además de mostrar características morfológicas similares a las descritas en estas investigaciones, permitieron observar un significativo desarrollo de las semillas de *P. coriocardia* hasta estadio de ruptura de testa.

Otros endófitos como *Nigrospora* y *Pestalotiopsis*, han sido relacionados con funciones beneficiosas a su planta hospedera por la producción de metabolitos secundarios y compuestos antifúngicos y antivirales, con una función de protección frente a patógenos y depredadores de plantas (Zhang, et al 2016; Pawle y Singh 2014; Deshmukh et al 2017). No obstante, se ha propuesto la hipótesis de un comportamiento menos altruista de parte de los hongos, ya que al alejar a estos patógenos estos endófitos podrían estar compitiendo con otros microorganismos por nichos potenciales (Stone et al 2011). De forma tal que los hongos actuarían como saprófitos o patógenos oportunistas, esperando la muerte de la planta -en el caso de epífitas, del forófito-, para aprovechar entonces los recursos disponibles. En esta investigación la mayor parte de géneros reportados como organismos saprófitos (*Coprinellus*, *Mycena*, *Xylaria*, *Psilocybe* entre otros), fueron aislados principalmente de sustratos en descomposición.



En cuanto al género *Coprinellus*, éste es conocido como un hongo saprófito (Selosse et al 2010; Hynson et al 2013; Texeira da Silva et al 2015); sin embargo, también ha sido reportado como micorrízico de la orquídea *Epipogon roseum*, sugiriéndose una alta especificidad de la orquídea con la familia de hongos Psathyrellaceae por la abundancia de pelotones presentes en sus raíces (Yamato et al 2005). Este género fue detectado de manera muy frecuente en nuestro estudio, resultado que concuerda con lo reportado por Salazar (2017). En dicho trabajo, realizado en la misma localidad, se aislaron hongos del género *Coprinellus* en todas las especies de orquídeas estudiadas, incluyendo *P. coriacardia*. Por otra parte, Guzmán y Moreno (2014) reportan para especies de *Epidendrum* y *Odontoglossum* colectadas en el mismo bosque, UTOs relacionados con las familias Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae, Sebacinaceae y Ascomycota. Lamentablemente no se mencionan géneros específicos en dicho trabajo.

4.2 Promoción del desarrollo embrionario de semillas de *P. coriacardia*

Germinación simbiótica *in vitro* de semillas se ha convertido en una metodología idónea para propagación y reintroducción de especies de orquídeas. Sin embargo, no existen reportes previos de ensayos de germinación, simbiótica o asimbiótica para la especie *P. coriacardia*. La única publicación sobre el género es la de León y Molina (2015) quienes reportan para *Pleurothallis truncata* un desarrollo de semillas en 10 semanas hasta aparición de la primera hoja verdadera (estado 4), en medio Murashige & Skoog modificado con agua de coco. En este mismo estudio se señala que el intento de germinación simbiótica con cepas tipo *Rhizoctonia*, no tuvo efecto alguno.

En el presente estudio muchos de los morfotipos evaluados presentaron características similares a las descritas en la literatura especializada para hongos micorrízicos; sin embargo, al evaluar el potencial de los hongos aislados como promotores del desarrollo embrionario de *P. coriacardia*, no excluimos a otras cepas en función de este criterio. Por el contrario, con el fin de evitar sesgos inconvenientes, evaluamos todos los morfotipos en el ensayo preliminar. De hecho, *Coprinellus* y *Fusarium*, géneros que no cumplen estrictamente con la condición antes mencionada, han sido descritos como hongos capaces de formar micorizas (ectomicorizas) en raíces de orquídeas (Chutima et al 2011; Yamato et al 2013). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman esta observación en los ensayos de promoción de desarrollo embrionario.

En esta investigación, demostramos que algunas de las cepas evaluadas promovieron el desarrollo embrionario de las semillas hasta estado 3 (ruptura de testa). No obstante, cabe destacar que los distintos porcentajes observados por estados de desarrollo de las semillas de *P. coriacardia*, fue muy variable al considerar el ensayo realizado (preliminar o definitivo) y a la cepa de hongo inoculada. Sin embargo, en el caso de la cepa 6M3 – *Ilyonectria*, se pudo observar un claro efecto en el desarrollo de las semillas en ambos ensayos de germinación. Para las cepas 18.2M2- *Nigrospora* y 12.1M3 aff *Rhizoctonia*, que en el ensayo preliminar promovieron el desarrollo hasta ruptura de la testa, observamos que, al modificar el pH del medio, su micelio presentó abundante crecimiento, pero no mostraron una influencia positiva sobre el desarrollo de las semillas después de 60 días de incubación. De hecho los embriones se hincharon hasta estado de desarrollo 2, pero a partir de allí no se observó ningún progreso.

En el caso de las cepas, 22M2.1-*Coprinellus* sp., 19M1.4.1-*Coprinellus*, 20M3-*Coprinellus*, 29M2.8-*Fusarium* y 26M1.4.1 *Nigrospora*, observamos un efecto mayor de estimulación del



desarrollo embrionario en las semillas de *P. coriacardia* en comparación con las cepas anteriormente mencionadas y también con los resultados registrados en el ensayo preliminar. Muy probablemente el cambio de pH determinó un mayor crecimiento de estas cepas, observándose que en todos los casos las hifas cubrieron la totalidad de la superficie del medio de cultivo. En todos los casos se observó hinchamiento considerable del embrión y ruptura de la testa hasta el término del experimento (120 días).

Se conoce muy poco sobre los factores bióticos y abióticos que podrían influenciar la colonización de ciertas especies de orquídeas por parte de ciertos hongos, y menos aún sobre cómo podrían condicionar su acción como promotores de la germinación. Se reporta sobre este tema, que el género *Epulorhiza*, reconocido hongo micorrízico de especies de orquídeas terrestres, se encuentra con mayor frecuencia en suelos con pH bajos (4,2-4,3), mientras que *Ceratorhiza* es más frecuente en raíces de orquídeas asociadas a suelos con pH más básicos (6,0-7,3) (Keel, et al 2011). Bonnardeaux et al (2007) reporta para hongos micorrízicos específicos de orquídeas que en condiciones sub-óptimas de cultivo, estas cepas se volvieron incompatibles y ocasionaron una necrosis de los protocormos. Este postulado podría explicar comportamientos distintos observados para las cepas de *Ilyonectria* y *Nigrospora*, que con condiciones de pH más bajas no permitieron un desarrollo adecuado de las semillas, por el contrario, causaron en las semillas un cambio de coloración evidente, muy posiblemente debida a la muerte de las semillas.

La diversidad de respuestas observadas en esta investigación por parte de las semillas frente a los distintos tratamientos, así como las diferencias en el comportamiento de las cepas de hongos utilizadas, permiten sugerir una alta complejidad entre sus interacciones. La sorprendente ausencia de porcentajes significativos de germinación de las semillas en medios suplementados con azúcares simples (Phytamax), ampliamente utilizados en germinación asimbiótica de orquídeas, que empleamos como “controles positivos” de germinación, sugiere que los períodos de germinación para la especie son largos. En tal sentido, la información disponible en distintos sitios web de cultivos de orquídeas y la experiencia obtenida en empresas locales de producción y venta de orquídeas (Villena P., com. pers.) reportan para el género *Pleurothallis* un período de germinación de oscila entre los 90 y 365 días en medios de cultivo ricos en nutrientes (B & T World Seeds. s/f), aunque no se describe la dinámica de desarrollo de las semillas hasta la formación del protocormo. Estudios similares atribuyen estos bajos porcentajes de germinación en medios nutritivos, a la necesidad que tienen ciertas especies de orquídeas por hongos que metabolizan los nutrientes disponibles y faciliten de esta forma la absorción de los mismos por parte de la planta para lograr su establecimiento (Zettler et al 1999).

Con respecto a la formación de estructuras más desarrolladas luego de los 150 días de siembra, similares a rizomas coraloides (Shefferson et al 2011), estas podrían ser consideradas como un estado de desarrollo más avanzado. Sin embargo no se puede confirmar esta observación al no haber observado el desarrollo de verdaderos rizomas. Será necesario evaluar estas semillas hasta la formación de hojas verdaderas para confirmar una germinación adecuada; además, en campo estas estructuras no fueron evidentes en especímenes adultos. Al no existir estudios previos con respecto al ciclo de desarrollo de las semillas de *P. coriacardia*, no se conoce con certeza su comportamiento. Zettler et al (1995), describen el desarrollo de *Spiranthes odorata* (Orchidaceae) con la ayuda de una ilustración, hasta el estado de germinación 3, donde se observa claramente un alargamiento del embrión con formaciones de tejido vegetal diferenciado, pero con rizoides, aunque en números reducidos. Este alargamiento, a manera de



cono, da lugar posteriormente a la producción de una zona para el desarrollo de las hojas verdaderas. En base a nuestras observaciones sugerimos que este tipo de desarrollo podría ser similar al de *P. coriacardia*.

En relación con las limitaciones del presente trabajo, podríamos destacar el sesgo que representa la etapa de desarrollo de los especímenes colectados para la caracterización de las comunidades de microorganismos endófitos que las colonizan. En efecto, solo trabajamos con plantas adultas, cuya edad es difícil de determinar. Sin embargo, distintos reportes mencionan la presencia de un mismo micobionte en especímenes de orquídeas colectadas en distintos estadios de desarrollo, desde protocormos hasta adultos (Hoang et al 2016). Jacquemyn et al (2007) reportan, además, que el éxito en el establecimiento de semillas de orquídea depende en mayor medida de la presencia de plantas adultas en las cercanías, que de la distancia de transporte de las semillas por el viento. Es lógico por lo tanto suponer que el mantenimiento de los micobiontes, a lo largo de todo su ciclo de vida, es crucial para la reproducción de la planta, aunque no se tiene claro cuál puede ser el beneficio percibido por el hongo. En el campo, fue posible observar protocormos de orquídeas tanto en sustratos arbóreos como en rocas, siempre rodeados por especímenes adultos. Sin embargo, no fue posible identificar correctamente protocormos de la especie *P. coriacardia*, pues la misma comparte sustrato con otras especies de orquídeas. Esa fue la razón que nos motivó a realizar la colección de raíces solamente a partir de especímenes adultos, bien identificados.

Por otro lado, en base a los resultados de esta investigación, no es posible confirmar de manera concluyente una relación micorrízica con los hongos evaluados en el ensayo definitivo. De hecho, estos no fueron aislados directamente a partir de pelotones en las raíces y su comportamiento como promotores del desarrollo embrionario podría deberse a una “especificidad funcional”, más que a una “especificidad ecológica” (Bayman y Otero 2006; Masuhara y Katsuya, K. 1994). Esto significaría que una misma cepa de hongo podría tener efectos positivos en la germinación de las semillas de varias especies de orquídeas.

En tal sentido, hongos endófitos aislados de distintas especies de orquídeas han sido reportados como productores de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal. Por ejemplo, *Fusarium* ha sido reportado como productor de auxinas y ácido giberílico en especies de orquídeas del género *Dendrobium*, *Sterostylis* y *Cymbidium*, promoviendo altos porcentajes de germinación y cumpliendo un rol importante en el desarrollo posterior de sus protocormos. Otro ejemplo son ciertas especies del género *Trichoderma*, conocido agente de biocontrol, reportado frecuentemente como endófito de orquídeas. Cepas pertenecientes a este género han promovido altos porcentajes de germinación de semillas de la orquídea *Pleione*, debido a la producción de las mencionadas sustancias reguladoras de crecimiento (Teixeira da Silva, et al 2015).

4.3 Comunidad de microorganismos endófitos

Este trabajo representa el primer acercamiento al estudio de las comunidades de microorganismos endófitos que colonizan las raíces de *Pleurothallis coriacardia*, incluyendo la descripción de una gran diversidad de microorganismos endófitos tanto hongos como bacterias. En el grupo de hongos, se encontró predominancia de los órdenes Atractiellales y Sebaciniales, en plantas colectadas en todos los sustratos de colonización de la especie. Ambos grupos han sido reportados previamente como micorrízicos de orquídeas de bosques neotropicales del Ecuador (Suárez et al 2016; Kottke et al 2010). Además, aunque en menor



frecuencia, reportamos la presencia de otros grupos micorrízicos como Tulasnellaceae, confirmando la gran diversidad de hongos micorrízicos en orquídeas de bosques montanos de los Andes (Kottke et al 2013; Cevallos et al 2016; Suárez et al 2008, Suárez et al 2006; Cruz et al 2011; Guzmán y Moreno 2014; Kennedy et al 2011).

La tendencia actual en relación con los estudios de micobiontes de orquídeas en el Ecuador está enfocada hacia la caracterización de cepas netamente micorrízicas, por lo que la metodología utilizada sesga, de cierta forma, los resultados obtenidos (Huang et al 2014). Este sesgo dificulta, además, la posibilidad de contrastar los resultados de diferentes estudios (Cevallos et al 2016). En el caso de *Pleurothallis lilijae*, por ejemplo, el único trabajo previo de micobiontes reporta asociaciones con cepas pertenecientes a clados cercanos a Sebaciniales y *Tulasnella* (Suárez et al 2006; Cruz et al 2011). En dicho trabajo se pudo confirmar la interacción mutualística entre hongo y orquídea por observación de tejido cortical de las raíces analizadas; sin embargo, no se reportó la presencia de cepas pertenecientes a grupos asociados a Ascomycota, probablemente debido al uso de cebadores específicos para la amplificación por PCR de los marcadores moleculares. Algo similar sucede para géneros de orquídeas simpátricas como *Stelis*, *Cryptothallis* y *Dactylorhiza*, en las cuales predomina la familia Tulasnellaceae como principal grupo fúngico asociado a sus raíces (Suárez et al 2008; Suárez et al 2006; Cruz et al 2011). Estos estudios sugieren, por tanto, una asociación entre orquídeas epífitas andinas con hongos ubicados en clados definidos. Sin embargo, no se exploraron otros grupos reportados como micorrízicos o de significancia simbiótica en experimentos de germinación como Psathyrellaceae y Nectriaceae.

Es importante considerar, que si bien investigaciones con fines de generación de conocimiento sobre comunidades de hongos micorrízicos asociados a orquídeas son importantes en términos de comprender dinámicas ecológicas; la preservación de cepas de hongos en bancos de germoplasma y en condiciones adecuadas a futuro permitirán el aprovechamiento de micobiontes, en procesos de reproducción de orquídeas con fines de conservación o de venta, además los organismos endófitos se proyectan con otras aplicaciones biotecnológicas interesantes (Gamboa-Gaitán 2006).

Para la caracterización de microorganismos endófitos en esta investigación, se utilizaron cebadores universales para hongos (Taylor y McCormick 2007), lo que permitió un tamizaje más completo de la comunidad. En contraste con lo reportado en relación con la predominancia de Tulasnellaceae en distintas especies de orquídeas (Suárez et al 2008; Preußing et al 2010) e incluso entre localidades (Cevallos et al 2016), los resultados obtenidos en la presente investigación muestran una baja frecuencia de Tulasnellaceae; incluso especies de esta familia no fueron detectadas en las muestras colectadas en rocas, sustrato que para especies de orquídeas presenta mayores dificultades para su establecimiento (Xing et al 2015; Bayman y Otero 2006). Por el contrario, géneros como *Coprinellus*, comprobado hongo micorrízico y de gran importancia para el desarrollo de las semillas en este estudio sí fue reportado para los cuatro sustratos, y con el reporte de Salazar (2017), con el registro del género en varias especies de orquídeas en el mismo sitio de estudio, se sugiere una estrecha relación entre este grupo de hongos y las orquídeas del bosque de Mazán, relación aún no definida.

Reportamos también una comunidad de hongos endófitos, muy diversa en términos de los posibles roles que puedan estar cumpliendo en su hospedero como en el ecosistema (Kottke et al 2008). Evidenciamos una clara predominancia de grupos saprófitos como: Xylariales,



Mycenaceae entre otros (Texeira da Silva et al 2015; Selosse et al 2010), además de clados de relevancia en estudios agronómicos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y otros (Stone et al 2011).

En cuanto a la comunidad de bacterias que colonizan las raíces de distintas especies vegetales, este grupo ha sido poco estudiado como endófitos de orquídeas (Bayman y Otero 2006); sin embargo, reportes recientes consideran una relación de ciertos grupos de bacteria como simbiontes de hongos micorrízicos (Bonfante y Anca 2009). Es decir, se hipotetiza que la interacción orquídea – microorganismos es mucho más compleja de lo que se pensaba, asignándole además a las bacterias un rol importante en el desarrollo de especies vegetales en la naturaleza. Hasta la fecha, no se han reportado asociaciones entre bacterias endófitas y orquídeas en los Andes del Ecuador. La mayor parte de reportes de bacterias endófitas de orquídeas viene de estudios en Australia donde se mencionan una alta predominancia de Cianobacterias y Proteobacterias, principalmente *Pseudomonas* (Bayman y Otero, 2006).

En nuestro estudio encontramos una elevada frecuencia de Cianobacterias asociadas a las raíces de *P. coriacardia*. Esto coincide con reportes previos que indican una interrelación muy fuerte entre epífitas y este grupo de bacterias, las cuales cumplirían una función de protección y de intercambio de nutrientes. Las cianobacterias parecen formar una capa gruesa que cubre las raíces aéreas de especies epífitas, facilitando un intercambio de nutrientes (fijación de N y CO₂) no solo con la especie vegetal si no también con hongos que habitan en ella (Texeira da Silva et al 2015). El grupo más representativo, después de las cianobacterias, es Rickettsiales para todos los sustratos analizados. Rickettsiales es conocido por su capacidad de crear endosimbiosis con especies vegetales, aunque también es reportado como patógeno de animales y plantas. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Mycobacterium* también fueron identificados aunque en menor abundancia. Todos estos géneros han sido reconocidos por tener un impacto positivo en el crecimiento de plantas por la producción de fitohormonas y otros metabolitos secundarios con función de protección, además de intervenir en procesos de asimilación y solubilización de fosfato, nitrógeno y otros minerales (Yu et al 2013). Estos géneros han sido comúnmente reportados como endófitos de orquídeas (Bonfante y Anca 2009; Tsavkelova et al 2001; Philippot et al 2013). En el grupo de las bacterias endófitas existió una clara diferencia en la composición de la comunidad en función al sustrato de colección, siendo muy diversa la comunidad colectada en Arrayán, con patrones comunitarios similares entre roca y *Ocotea* sp.

En relación con las diferencias entre las comunidades de microorganismos detectados en orquídeas que colonizan sustratos arbóreos y rocas, fue posible registrar ligeras diferencias en composición, únicamente significativas para bacterias. Podemos sugerir en base a los resultados obtenidos que las comunidades de microorganismos asociados a raíces de *P. coriacardia* que crecen en sustratos arbóreos fueron más diversas que en sustratos rocosos. Este resultado coincide con lo encontrado por Xing et al (2015) para la comunidad de hongos micorrízicos. Según estos autores, especies litófitas están expuestas a condiciones extremas comparado con epífitas, lo que podría plantear una dependencia mayor hacia cierto tipo de hongos micorrízicos específicos para su germinación, limitando así la diversidad de micobiontes que colonizan sus raíces (Otero et al 2005; Rasmussen y Rasmussen 2009). Además contrastando la información obtenida de la comunidad de hongos cultivables, el forófito Arrayán en todos los casos, mostró mayor riqueza de taxones exclusivos. Este árbol además resultó ser el que mostró mayor frecuencia y riqueza de orquídeas epífitas entre adultos y principalmente protocormos, mientras que sustratos rocosos mostraron una mayor



frecuencia de individuos de *P. coriacardia* en proceso de propagación clonal. Estudios posteriores en este forófito y en el bosque de Mazán podrían resultar interesantes para contribuir a resolver interrogantes sobre especificidad de micorrizas hacia una o varias especies de orquídeas, así como tendencias sobre la influencia de estas comunidades de microorganismos en la selección de sustratos por parte de la orquídea.

Este trabajo contribuye al entendimiento de interacciones complejas de orquídeas de los Andes y sus huéspedes endófitos. La presencia de especies de la familia Psathyrellaceae sugiere una estrecha relación entre este grupo de hongos y las orquídeas del bosque de Mazán, relación aún no definida, pero si se confirma un rol importante como promotores de desarrollo embrionario, sin descartar interesantes funciones ecológicas de otros endófitos fúngicos cultivables como *Ilyonectria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, entre otros. Desde una perspectiva de conservación de la biodiversidad, los resultados obtenidos en los ensayos de desarrollo de semillas, pueden contribuir a orientar el enfoque de nuevos estudios sobre las relaciones microorganismo-orquídea. Por ejemplo, planteamos la posibilidad de intentar la “captura” de hongos con “trampas” de semillas. También se vislumbra la posibilidad de generar nuevas líneas de investigación con fines de caracterizar los metabolitos producidos por los hongos identificados durante este trabajo, con aplicaciones potenciales en el campo biotecnológico.



REFERENCIAS

- Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., ... y Sen, R. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186(2), 281-285.
- Addinsoft. (2014). XLSTAT (Version 2014.5.03). [Software] Recuperado de: <http://www.xlstat.com>.
- Altschul, S., Madden, T., Shaffer, A., Zhang, J., Zhag, Z., Miller, W., y Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database research programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R., Márquez-Valdelamar, L. M., Arellano-Torres, E., (2016). Clavulina-Membranomyces is the most important lineage within the highly diverse ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*, 27(1), 53-65. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0724-1>
- B & T World Seeds. (s/f). Germination guide *Pleurothallis*. Obtenido de B & T World Seeds: <http://b-and-t-world-seeds.com/cartall.asp?species=Pleurothallis%20platystachia&sref=7213>
- Batty, A., Dixon, K., Brundrett, M., y Sivasithamparam, K. (2002). Orchid Conservation and Mycorrhizal associations. En: K. Sivasithamparam, K.W. Dixon y R.L. Barrett (eds), *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity* (pp. 195–226). Kluwer Academic Publishers.
- Bayman, P., y Otero, J. T. (2006). Microbial Endophytes of Orchid Roots, En: B. Schulz, C. Boyle, T.N. Sieber (Eds), *Soil Biology* (pp. 153-177), Verlag Berlin Heidelberg. Springer.
- Beltrán, J.B. (2001). *Composición florística, estructura y dinámica del Bosque Primario en Mazán, Cuenca, Ecuador*. (Tesis de pregrado). Universidad del Azuay, Cuenca-Ecuador.
- Bonfante, P., y Andra Anca, I. (2009). Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria : A Network of Interactions. *Annu Rev. Microbiol.* 63:363-83 <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M. S., Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., ... y Vilgalys, R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants, *Molecular Ecology* 23:3356–3370. <https://doi.org/10.1111/mec.12821>
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., y Sivasithamparam, K. (2007) Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relation- ships and alien invasions. *Mycol Res* 111:51–61
- Borba, E., Semir, J., y Shepherd, G. (2001). Self-incompatibility, Inbreeding Depression and Crossing Potential in Five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species. *Annals of Botany*, 88:89–99. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1435>
- Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., y Crous, P. W. (2012). *Cylindrocarpus* root rot : multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycol Progress* 11:655–688. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>
- CaraDona, P., y Ackerman, J. (2012). Reproductive assurance for a rewardless epiphytic orchid in Puerto Rico: *Pleurothallis ruscifolia* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). *Caribbean Journal of Science*, 46(2–3), 249-257.
- Cennis, J.L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20(9):2380



- Cevallos, S., Sánchez-Rodríguez, A., Decock, C., Declerck, S., & Suárez, J. P. (2017). Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids? *Mycorrhiza*, 27(3), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0746-8>
- Chutima, R., y Dell, B. (2011). Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand, *Mycorrhiza* 21: 221–229. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0327-1>
- Colwell, R.K. (2013) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. (Version 9.1.0) [Software] Recuperado de: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>
- Crespo, A., y Ortega, M.B. (2015). *Aislamiento de micorrizas y evaluación de la germinación simbiótica de las semillas de las orquídeas en el orquideario de la Universidad de Cuenca*. (Tesis de Pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., y Barrett, R. L. (2003). Orchid Conservation: a global perspective. En: K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett and P.J. Cribb, *Orchid Conservation* (pp. 1–24). Kota Kinabalu, Sabah. Natural History Publications.
- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I., Piepenbring, M., y Oberwinkler, F. (2011). Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress*, 10(2), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s11557-010-0692-3>
- Currah, R. S. (1987). *Thanatephorus pennatus* sp nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 65(9), 1957–1960.
- de Bary A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose. In: K.J. Trübner (ed.) *Vortrag auf der Versammlung der Naturforscher und Aerzte zu Cassel*. (pp. 21-22) Strassburg.
- Deshmukh, S. K., Prakash, V., y Ranjan, N. (2017). Recent advances in the discovery of bioactive metabolites from *Pestalotiopsis*. *Phytochemistry Reviews*, 1-38.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., y Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological progress*, 2(2), 149-160.
- Gamboa-Gaitán, M. A. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 3–20.
- Geml, J., Pastor, N., Fernández, L., Pacheco, S., Semenova, T. A., Becerra, A. G., y Nouhra, E. R. (2014). Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Molecular Ecology*, 23(10), 2452-2472. <https://doi.org/10.1111/mec.12765>
- Glynou, K., Ali, T., Buch, A., Kia, S. H., Ploch, S., Xia, X., Maciá-vicente, J. G. (2015). The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental Microbiology*. 18(8), 2418-2434. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13112>
- Gowland, K. M., Wood, J., Clements, M. A., & Nicotra, A. B. (2011). Significant phorophyte (substrate) bias is not explained by fitness benefits in three epiphytic orchid species. *American Journal of Botany*, 98(2), 197-206.
- Guzmán Salinas, N., y Moreno Coronado, B. J. (2014). *Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del Sur del Ecuador*. (Tesis de pregrado). Universidad del Azuay, Cuenca-Ecuador.
- Hammer O., Harper D., y Ryan, P. (2011). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electrónica*. 4(1):1-9



- Hammer y Harper (2013). PAST (ver 2.17c) [Software] Recuperado de: <http://folk.uio.no/ohammer/past>.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jurgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., y Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME Journal*, 5:1571-1579. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Hoang, N. H., Kane, M. E., Radcliffe, E. N., Zettler, L. W., y Larry, W. (2016). Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. *Annals of Botany* 119(3), 379-393. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw220>
- Huang, C. L., Jian, F. Y., Huang, H. J., Chang, W. C., Wu, W. L., Hwang, C. C., ... & Chiang, T. Y. (2014). Deciphering mycorrhizal fungi in cultivated *Phalaenopsis microbiome* with next-generation sequencing of multiple barcodes. *Fungal Diversity*, 66(1), 77-88. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0281-x>
- Hynson, N. A., Weiss, M., Katja, P., Gebauer, G., y Treseders, K. (2013). Fungal host specificity is not a bottleneck for the germination of *Pyroleae* species (Ericaceae) in a Bavarian forest. *Molecular Ecology*, 22(5), 1473-1481. <https://doi.org/10.1111/mec.12180>
- Jacquemyn, H., Brys, R., Vandepitte, K., Honnay, O., Roldán-Ruiz, I., y Wiegand, T. (2007). A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist*, 176(2), 448-459.
- Jacquemyn, H., Honnay, O., Cammue, B., Brys, R., y Lievens, B. (2010). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*, 19(18), 4086-4095.
- Jankowiak, R., Bilański, P., Paluch, J., y Kołodziej, Z. (2016). Fungi associated with dieback of *Abies alba* seedlings in naturally regenerating forest ecosystems. *Fungal Ecology*, 24, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.08.013>
- Jiménez, M. (2015). Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado. *Actualidad*. 1-3.
- Jin, H., Yan, Z., y Liu, Q. (2013). Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China, *Antonie van Leeuwenhoek* 104:949-963. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0014-2>
- Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E. y Richardson L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)- preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:313-323. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9270-z>
- Jørgensen, P. M., Ulloa, C., Maldonado, C., Garden, M. B., Box, P. O., y Louis, S. (2006). Riqueza de plantas vasculares. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 37-50.
- Keel, B. Zettler, L. Kaplin, B. (2011). Seed germination of *Habenaria repens* (Orchidaceae) in situ beyond its range, and its potential for assisted migration imposed by Climate Change. *Castanea*. 76(1):43-54.
- Keim, J., Mishra, B., Sharma, R., Ploch, S., y Thines, M. (2014). Root-associated fungi of *Arabidopsis thaliana* and *Microthlaspi perfoliatum*. *Fungal Diversity*, 66(1), 99-111. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0289-2>
- Kennedy, A., Taylor, L., y Watson, L. (2011). Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Molecular Ecology*, 20: 1303-1316. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05000.x>
- Kottke, I., y Suárez, J.P. (2009). Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*, 84-99.



- Kottke, I., Setaro, S., Haug, I., Herrera, P., Cruz, D., Fries, A., Gawlik, J., Homeier, J., Werner, F., Gerique, A., y Suárez, J.P. (2013). Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rain forest ecosystem: perspectives for understanding complex communities. En: J. Bendix, E. Beck, A. Bräuning, F. Makeschin, R. Mosandl, S. Scheu, y W. Wilcke (Eds.), *Ecosystem services, biodiversity and environmental change in a tropical mountain ecosystem of south Ecuador* (pp. 187 - 203). Verlag Berlin Heidelberg. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38137-9>
- Kottke, I., Haug, I., Setaro, S., Suárez, J. P., Weiß, M., Preußing, M., ... y Oberwinkler, F. (2008). Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*, 9(1), 13-23.
- Kottke, I., Suarez, J. P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., y Garnica, S. (2010). Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic Neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1685), 1289–1298. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1884>
- Kristiansen, K.A., Freudenstein, J.V., Rasmussen, F.N., Rasmussen, H.N. (2004) Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Mol Phylogenet Evol* 33:251-258
- León, T., y Molina, R. (2015). *Aislamiento y selección de micorrizas con evaluación preliminar de su efecto en la germinación de orquídeas en el orquideario de la Universidad de Cuenca*. (Tesis de Pregrado) Universidad de Cuenca, Cuenca-Ecuador.
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(10), 999-1002.
- Ma, X., Kang, J., Nontachaiyapoom, S., Wen, T., y Hyde, K. D. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*.108:1-16
- Maherali, H., y Klironomos, J. N. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 316(5832), 1746–1748. <http://doi.org/10.1126/science.1143082>
- Manici, L. M., Kelderer, M., Franke-Whittle, I. H., Rühmer, T., Baab, G., y Nicoletti, F. (2013). Relationship between root-endophytic microbial communities and replant disease in specialized apple growing areas in Europe. *Applied Soil Ecology*, 72, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.011>
- Masuhara, G., y Katsuya, K. (1994). In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp . and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol*, 127: 711–718.
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T - Manuales y Tesis SEA*, 1, 84. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103709>
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., Prado, G., Gómez-Carabalí, A., & Otero, J. T. (2013). The double life of *Ceratobasidium*: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. *Mycologia*, 105(1), 141–50. <http://doi.org/10.3852/12-079>
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 2017 GenBank Databases. USA
- Newton, A.C., Fitt, B.D., Atkins, S.D., Walters, D.R., y Daniell, T.J. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in microbiology*, 18(8), 365-373.



- Obase, K., y Matsuda, Y. (2014). Culturable fungal endophytes in roots of *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae). *Mycorrhiza*, 24(8), 635-44. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0584-5>
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., y Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <http://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Otero, J.T., Flanagan, N.S., Herre, E.A., Ackerman, J.D., y Bayman, P. (2007). Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the Neotropical epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 94(12), 1944–1950. <http://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1944>
- Otero, J.T., Bayman, P., & Ackerman, J.D. (2005). Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* *in vitro*: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology*, 19(1), 29-43.
- Ovando, I., Damon, A., Bello, R., Ambrosio, D., Albores, V., Adriano, L., & Salvador, M. (2005). Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal of Plant Sciences*. 4(3), 309-315.
- Pawle, G., y Singh, S. K. (2014). Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. *Curr Res Environ Appl Mycol*, 4(1), 1-9.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., y Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Phillips, R.D., Barrett, M.D., Dixon, K.W., y Hopper, S.D. (2011). Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids?, *Journal of Ecology*, 99(3), 858-869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01797.x>
- Preußing, M., Nebel, M., Oberwinkler, F., y Weiß, M. (2010). Diverging diversity patterns in the *Tulasnella* (Basidiomycota, Tulasnellales) mycobionts of *Aneura pinguis* (Marchantiophyta, Metzgeriales) from Europe and Ecuador. *Mycorrhiza*, 20(3), 147–159. <http://doi.org/10.1007/s00572-009-0275-9>
- Rasmussen, H.N., & Rasmussen, F.N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118(3), 334-345.
- Riofrío, L., Naranjo, C., Iriondo, J., y Torres, E. (2007). Spatial structure of *Pleurothallis*, *Masdevallia*, *Lepanthes* and *Epidendrum* epiphytic orchids in a fragment of montane cloud forest in South Ecuador. *Lankesteriana*. 7(1-2):102-106.
- Riofrío, M.L., Cruz, D., Torres, E., de La Cruz, M., Iriondo, J.M., y Suárez, J.P. (2013). Mycorrhizal preferences and fine spatial structure of the epiphytic orchid *Epidendrum rhopalostele*. *American Journal of Botany*, 100 (12): 2339–2348. <http://doi.org/10.3732/ajb.1300069>
- Rodríguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E., y Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.
- Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T., y Jones, E. (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. *Fungal Diversity*, (1991), 139–161.
- Salazar, J. (2017). *Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas*. (Tesis de Maestría) Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador.



- Seaton, P., y Ramsay, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semillas*. Kew. Richmond, UK. 82pp.
- Selosse, M.A., Martos, F., Perry, B.A., Padamsee, M., Roy, M., Paillet, T. (2010) Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids: finding treasures among the 'molecular scraps'?. *Plant Signal Behav*, 5:349–353
- Sharma, J., Zettler, L., Van Sambeek, J., Ellersieck, M., Starbuck, C. (2002). Symbiotic seed germination and Mycorrhizas of Federally Threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). *Am. Midl. Nat.* 149:104-120.
- Shefferson, R.P., McCormick, M.K., Whigham, D.F., y O'Neill, J.P. (2011). Life history strategy in herbaceous perennials: inferring demographic patterns from the aboveground dynamics of a primarily subterranean, myco-heterotrophic orchid. *Oikos*, 120(9), 1291-1300. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19130.x>
- Stone, J.K., Polishook, J., y White, J.F. (2011). Edophytic fungi. En: G.M. Mueller. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods* (pp. 241-269). Burlington. Academic Press.
- Suárez, J.P., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., y Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257–1270. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.08.004>
- Suárez, J.P., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., y Kottke, I. (2008). Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a Neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2), 75–85. <http://doi.org/10.1007/s11557-008-0554-4>
- Suárez, J.P., y Kottke, I. (2016). Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana*, 16(2), 299-305..
- Sun, X., y Guo, L. D. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65-76. <https://doi.org/10.1080/21501203.2012.656724>
- Tao, G., Liu, Z., Hyde, K., Lui, X., y Yu, Z. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchideaceae). *Fungal Divers*, 33, 101–122. Retrieved from <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-6.pdf>
- Taylor, D.L., y McCormick, M.K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177(4), 1020-1033.
- Teixeira, J.A., Tsavkelova, E.A., Zeng, S., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., ... y Rao, M. V. (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242(1), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>
- Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Lobakova, E.S., Kolomeitseva, G.L., y Netrusov, I. (2001). Microbiota of the Orchid rhizoplane. *Mikrobiologiya*, 70(4), 567–573. <https://doi.org/10.1023/A:1010402715376>
- Unterseher, M., Per, D., y Schnittler, M. (2013). Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. *Fungal Diversity*, 60:43–54. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0222-0>
- Valencia, R. (2010). *Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Quito.
- Velivelli, S.L., Kromann, P., Lojan, P., Rojas, M., Franco, J., Suarez, J. P., y Prestwich, B.D. (2014). Identification of mVOCs from Andean *Rhizobacteria* and field evaluation of



- bacterial and mycorrhizal inoculants on growth of potato in its center of origin. *Microbial Ecology*, 69(3), 652-667.. <http://doi.org/10.1007/s00248-014-0514-2>
- Vilgalys, R., Hester, M., (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Waterman, R.J., y Bidartondo, M.I. (2008). Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1085-1096. <http://doi.org/10.1093/jxb/erm366>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322) New York, Academic Press, Inc.
- Williams, K. P., Sobral, B. W., & Dickerman, A. W. (2007). A robust species tree for the alphaproteobacteria. *Journal of bacteriology*, 189(13), 4578-4586.
- Xing, X., Gai, X., Liu, Q., Hart, M. M., y Guo, S. (2015). Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid. *Mycorrhiza*, 25(4), 289-296. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0612-5>
- Yamato, M., Yagame, T., Suzuki, A., y Iwase, K. (2005). Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience*, (46), 73-77. <https://doi.org/10.1007/s10267-004-0218-4>
- Yoder, J., Zettler, L., Stewart, S. (2000). Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*. 156:145-150.
- Yokoya, K., Zettler, L. W., Kendon, J. P., Bidartondo, M. I., Stice, A. L., Skarha, S., Sarasan, V. (2015). Preliminary findings on identification of mycorrhizal fungi from diverse orchids in the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 10:0-12. <http://doi.org/10.1007/s00572-015-0635-6>
- Yu, J., Zhou, X. F., Yang, S. J., Liu, W. H., y Hu, X. F. (2013). Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9825-9836.
- Zettler, L., Sharma, J., y Rasmussen, N. (2003) Mycorrhizal diversity En: K. Dicon, S.P. Kell, R.L. Barrett, P.J. Cribb. *Orchid Conservation*. (pp. 205-226). Kota Kinabalu, Sabah. Natural History Publications.
- Zettler, L. (1997). Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and Perspectives. *Selbyana*. 18(2):188-194.
- Zettler, L., Barrington, F., y McInnis T. (1995). Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture. *Lindleyana*. 10(3): 211- 216.
- Zettler, L., Burkhead, J., Marshall, J., (1999). Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampenseis* in vitro. *Lindleyana*. 14(2):102-105.
- Zettler, L., Corey, L., Jacks, A., Gruender, L., y López, A. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tulasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in south Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*, 13(1-2): 119-128.
- Zettler, L., Delaney, T., y Sunley, J. (1998). Seed propagation of the epiphytic green fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. *Sebyana* 19(2); 249-253.



- Zettler, L., y Piskin, K.. (2011). Mycorrhizal fungi from Protocorms, seedling and mature plants of the Eastern prairie fringed orchid, *Plantanthera leucophaea* (Nutt.) Lidley: A comprehensive list to augment conservation. *Am. Midl. Nat.* 166:29-39.
- Zettler, L., y McInnis, T. (1993). Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana* 8(3):155-162.
- Zhang, S. P., Huang, R., Li, F. F., Wei, H. X., Fang, X. W., Xie, X. S., ... y He, J. (2016). Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora* sp. from *Aconitum carmichaeli*. *Fitoterapia*, 112, 85-89.

Anexos

Anexo1. Registro de cepas de hongos aisladas a partir de raíces de *P. coriocardia*

Código Hongo	Tipo Forófito	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Asignación Taxonómica Final
1MF6	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
1MF1	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
1MF4	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
1MF3	Otro Forófito					No Identificado	M28
1MF5	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Amphisphaeriaceae	Pestalotiopsis	<i>Pestalotiopsis</i>
1MF2	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocibe coprophila</i>
2MR2	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Incertae_sedis	Apiosporaceae	Arthrinium	<i>Arthrinium phaeospermum</i>
2MF4	Roca	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Mucoraceae	Helicostylum	<i>Helicostylum</i>
2MR1	Roca	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	Rhizoctonia	<i>Aff Rhizoctonia</i>
2MR3	Roca	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	Rhizoctonia	<i>Aff Rhizoctonia</i>
3MR3	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Hypocrea	<i>Hypocrea</i>
3MR2	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Protocrea	<i>Protocrea farinosa</i>
3MR1	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
3MR5	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
4MF3	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Incertae_sedis	Apiosporaceae	Arthrinium	<i>Arthrinium phaeospermum</i>
4MF2	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
4MF1	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>



5MF4	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Incertae_sedis	Apiosporaceae	Arthrini	<i>Arthrini phaeospermum</i>
5MF3	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
5.1MF3	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
5.1MF7	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
5.1MF1	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Mycenaceae	Mycena	<i>Mycena</i>
5.1MF4	En descomposición					No Identificado	M35
5.1MF5	En descomposición					No Identificado	M36
5.1MF2	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	Rhizoctonia	<i>Aff Rhizoctonia</i>
5.1MF6	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	Rhizoctonia	<i>Aff Rhizoctonia</i>
5MF1	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
5MF2	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
6MF2	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
6MF3	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Ilyonectria	<i>Ilyonectria</i>
6MF1	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
7MR5	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Gibberella	<i>Gibberella</i>
7MR2	Roca					No Identificado	M37
7MR4	Roca	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	unidentified	<i>Psathyrellaceae</i>
8MF6	Otro Forófito	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	<i>Aspergillus sp.</i>
8MF2	Otro Forófito	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	<i>Aspergillus sp.</i>
8MF1	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
8MF3	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
8MF4	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>



8MF5	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	unidentified	<i>Nectriaceae</i>
9.3MF4	En descomposición	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	<i>Aspergillus sp.</i>
9.1MF2	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
9.3MF5	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
9.1MF1	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
9.3MF6	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
9.3MF2	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
9.2MF3	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium G1</i>
9.1MF3	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fusarium</i>
9.2MF1	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
9.1MF7	En descomposición					No Identificado	M43
9.2MF2	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
9.1MF4	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
9.3MF1	En descomposición	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Umbelopsidaceae	Umbelopsis	<i>Umbelopsis</i>
10MF2	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	Bionectria	<i>Bionectria ochroeuca</i>
9.3MF7	En descomposición					No Identificado	M45
10MF1	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	unidentified	<i>Nectriaceae</i>
10MF4	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	unidentified	<i>Nectriaceae</i>
11.1MF1	Otro Forófito	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Mucoraceae	Absidia	<i>Absidia psychrophilia</i>
11.1MF2	Otro Forófito	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	<i>Aspergillus sp.</i>
11.1MF3	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>



10MF3	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	unidentified	<i>Nectriaceae</i>
11.2MF2	Otro Forófito	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Mucoraceae	Absidia	<i>Absidia psychrophilia</i>
12MF1	Ocotea sp.	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Epicoccum	<i>Epicoccum</i>
12MF2	Ocotea sp.	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Epicoccum	<i>Epicoccum</i>
12MF5	Ocotea sp.	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Epicoccum	<i>Epicoccum</i>
12MF6	Ocotea sp.	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Epicoccum	<i>Epicoccum</i>
12.1MF2	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
12.1MF4	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
12MF3	Ocotea sp.	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	Xylaria	<i>Xylaria</i>
14MF2	Weinmannia fagaroides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium G1</i>
12.1MF3	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	Rhizoctonia	<i>Aff Rhizoctonia</i>
14MF3	Weinmannia fagaroides	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	Xylaria	<i>Xylaria</i>
15MF1	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
14MF6	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M49
15MF2	Otro Forófito	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
15MF6	Otro Forófito					No Identificado	M51
17MF1	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>
17MF2	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>
17MF4	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>
17MF5	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>
17MF6	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>



17MF7	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>
16MF3	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M52
18.2MF4	Ocotea sp.	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
18.2MF2	Ocotea sp.	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
17MF3	Roca					No Identificado	M53
18MF2	Ocotea sp.					No Identificado	M21
18.2MF3	Ocotea sp.					No Identificado	M56
18.1MF3	Ocotea sp.	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
18MF4	Ocotea sp.	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	Phoma	<i>Phoma exigua</i>
19MF1.4.1	Weinmannia fagaroides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
19MF2	Weinmannia fagaroides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
18MF3	Ocotea sp.					No Identificado	M57
20M6	Ocotea sp.	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium</i>
20MF3	Ocotea sp.	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
19MF3	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M61
20MF4	Ocotea sp.					No Identificado	M64
21MF2	Ocotea sp.	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
21MF4	Ocotea sp.	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
21MF1	Ocotea sp.	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
20MF1	Ocotea sp.					No Identificado	M-Pholiota
22MF2.1	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>



22MF2.3	Otro Forófito	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
21MF3	Ocotea sp.					No Identificado	M65
22MF1	Otro Forófito					No Identificado	M66
22MF	Otro Forófito	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Umbelopsidaceae	Umbelopsis	<i>Umbelopsis</i>
22MF3	Otro Forófito	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Umbelopsidaceae	Umbelopsis	<i>Umbelopsis ramanniana</i>
22MF4	Otro Forófito					No Identificado	M70
23MF	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M117
23MF2	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M72
23MF4	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M74
23MF5	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M75
23MF3	Weinmannia fagaroides	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Umbelopsidaceae	Umbelopsis	<i>Umbelopsis isabellina</i>
24MF3	Ocotea sp.	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Acrenomium	<i>Aff. Acrenomium</i>
24MF2	Ocotea sp.	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium 4</i>
23MF6	Weinmannia fagaroides					No Identificado	M76
24MF1	Ocotea sp.	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Mucoraceae	Absidia	<i>Absidia psychrophila</i>
25MF1	Weinmannia fagaroides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
26MF1	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Hypocrea	<i>Hypocrea</i>
26MF1.4.1	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
26MF1.4	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
26MF1.4.2	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
25MF3	Weinmannia fagaroides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocybe coprophila</i>



27MF	En descomposición	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
27MFA	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium G2</i>
26MF1.4.4	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
27MF3	En descomposición	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Fungal endophyte</i>
28MF	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Trichosphaeriales	Incertae_sedis	Nigrospora	<i>Nigrospora</i>
28MFN2	En descomposición					No Identificado	M21
28MFN1	En descomposición	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>Trichoderma</i>
27MF2	En descomposición	Zygomycota	Incertae_sedis	Mucorales	Umbelopsidaceae	Umbelopsis	<i>Umbelopsis</i>
29M3	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Acrenomium	<i>Aff. Acrenomium</i>
29M2.3.2	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Acrenomium	<i>Aff. Acrenomium</i>
29M2.3.1	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Incertae_sedis	Cercosporidium	<i>Cercosporidium</i>
29M4	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Cylindrocladium	<i>Cylindrocladiella</i>
29M2.1	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	Diaporthe	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
29M2.5	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	Diaporthe	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
29M2.5.1	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	Diaporthe	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
29M9	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium 3</i>
29M2.8	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium G1</i>
28MF1	En descomposición					No Identificado	M87
29M6	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M101
29M8	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M103
29M1	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocybe coprophila</i>



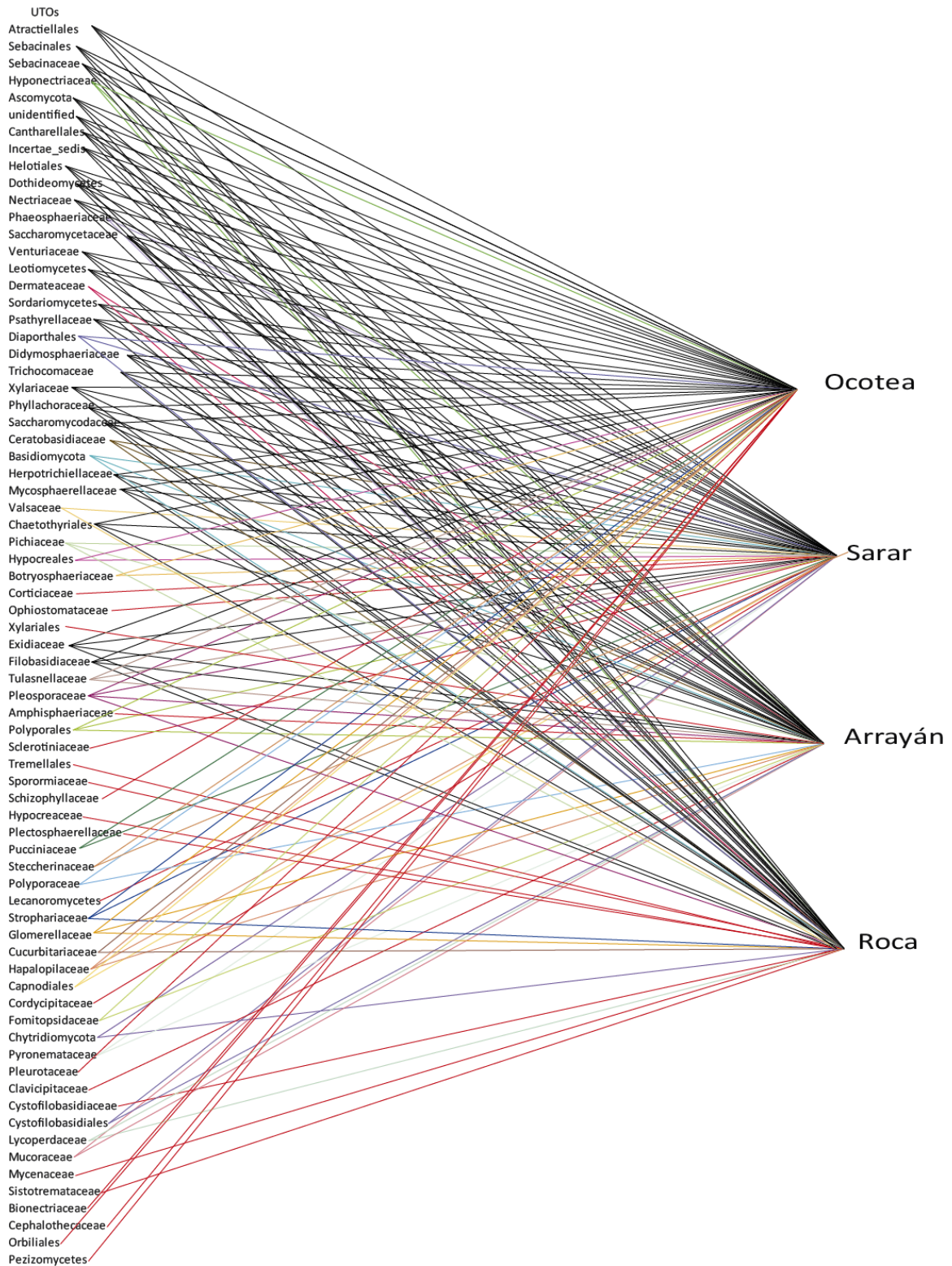
29M2	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocybe coprophila</i>
29M7	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocybe coprophila</i>
29M2.2	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocybe coprophila</i>
29M2.6	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	Psilocybe	<i>Psilocybe coprophila</i>
29M2.7	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Incertae_sedis	unidentified	unidentified	<i>Sordariomycetes</i>
30M6	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium 5</i>
29M2.4	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M23
30M2.2	Roca	Ascomycota	Sordariomycetes	Incertae_sedis	unidentified	unidentified	<i>Sordariomycetes</i>
31M2.2	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Acrenomium	<i>Aff. Acrenomium</i>
30M2.1	Roca					No Identificado	M105
31M2.6	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M11
31M2	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M23
31M2.1	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M25
31M2.4	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M26
31M1	Myrcianthesrhopaloides	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Fungal endophyte/Rosellinia</i>
32M2.2	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
32M6	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
32M3	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	Coprinellus	<i>Coprinellus</i>
32M4	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium G1</i>
31M2.3	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M52
32M5	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	unidentified	<i>Nectriaceae</i>



33M2.2	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Hapalopilaceae	Gelatoporia	<i>Gelatoporia subvermispora</i>
33M2.3	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Helotiaceae	Hymenoscyphus	<i>Hymenoscyphus</i>
33M2.1	Myrcianthesrhopaloides	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae	Trametes	<i>Trametes hirsuta</i>
32M2.1	Myrcianthesrhopaloides	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Fungal</i>
33M2.4	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	unidentified	<i>Nectriaceae</i>
33M2.7	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M26
35M4	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fungal/Fusarium G2</i>
35M1	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fusarium</i>
35M3	Myrcianthesrhopaloides	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	<i>Fusarium</i>
34M2	Roca					No Identificado	M121
35M5	Myrcianthesrhopaloides					No Identificado	M123

Anexo 2. Unidades Taxonómicas Operacionales de la comunidad de Microorganismos endófitos que colonizan las raíces de *P. coriocardia*, representada en los distintos sustratos de crecimiento de la especie. A2.1 Hongos endófitos A2.2 Bacterias endófitas

A2.1 Hongos endófitos



A2.2 Bacterias endófitas

